

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E DA SAÚDE - CCENS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**

**LAIS OLIVEIRA RODRIGUES**

**DEFENSIVOS ALTERNATIVOS PARA CONTROLE DA ANTRACNOSE E  
PINTA-PRETA EM MAMÃO**

**ALEGRE-ES  
2019**

LAIS OLIVEIRA RODRIGUES

**DEFENSIVOS ALTERNATIVOS PARA CONTROLE DA ANTRACNOSE E  
PINTA-PRETA EM MAMÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestra em Agroquímica, linha de pesquisa em Química Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Moises Zucoloto.

ALEGRE - ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

R696d      Rodrigues, Lais Oliveira, 1995-  
Defensivos alternativos para o controle da antracnose e  
pinta-preta em mamão / Lais Oliveira Rodrigues. - 2019.  
65 f. : il.

Orientador: Moises Zucoloto.  
Coorientadores: Adilson Vidal Costa, Willian Bucker  
Moraes.  
Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e  
da Saúde.

1. Doenças. 2. Óleos essenciais. 3. Triazóis. I. Zucoloto, Moises.  
II. Costa, Adilson Vidal. III. Moraes, Willian Bucker. IV.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Exatas, Naturais e da Saúde. V. Título.

CDU: 631.41

---

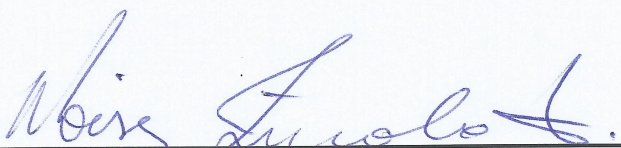
**LAIS OLIVEIRA RODRIGUES**

**DEFENSIVOS ALTERNATIVOS PARA CONTROLE DA ANTRACNOSE E  
PINTA-PRETA EM MAMÃO**

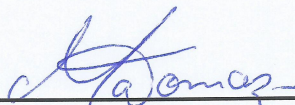
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde – CCENS, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Agroquímica, linha de pesquisa em Química Ambiental.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2019.

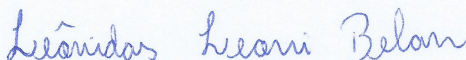
**COMISSÃO EXAMINADORA**



Prof. Dr. Moises Zucoloto  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador



Prof. Dr. Marcelo Antonio Tomaz  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinador



Pesquisador Dr. Leônidas Leoni Belan  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinador externo

Aos meus pais, Isac e Luciene, pelo amor incondicional, dedicação e exemplo, sendo os principais responsáveis por essa realização. Com todo meu amor.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre ao meu lado guiando meus passos, dando-me paciência e sabedoria para suplantar cada momento de complexidade.

Aos meus pais, por todo amor, carinho, paciência, dedicação e por serem meu maior exemplo de seres humanos.

Aos meus irmãos, Gustavo e Fernanda, que sonharam junto comigo, encorajando-me nos momentos que eu pensava em desistir.

Ao Giuseppe, por todos os momentos de companheirismo, os quais me traziam leveza e paz, ao passo que ia me aconselhando, acalmando e entendendo todos os momentos que estive ausente, sendo minha peça chave para conseguir concluir o mestrado. Toda minha gratidão e amor.

Ao meu orientador, Professor Dr. Moises Zucoloto, que encarou o desafio e foi o melhor orientador que eu poderia ter, contornando as situações adversas e proporcionando meu crescimento. Minha eterna gratidão.

Ao professor Willian Bucker e ao professor Adilson Costa, pela coorientação e empenho na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Tomaz e ao pesquisador Dr. Leônidas Belan, por fazerem parte da comissão de avaliação e contribuírem com considerações pertinentes para a realização de um bom trabalho.

À Universidade Federal do Espírito Santo, por proporcionar a realização desta pesquisa, através do Laboratório de Química (LQ1) e do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), através da equipe do LEMP (Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas Agrícolas), com seus colaboradores, especialmente ao Leônidas, Regina e Weliton, agradeço imensamente.

Ao Jhon Lennon Garbe e a Natália Guedes, por contribuírem, se dedicarem à minha pesquisa e por terem se tornado grandes amigos.

Aos amigos conquistados nessa etapa: Caio, João Paulo, Aldino, Tiago e Nayara; e às meninas da Tribo, Karol, Layane, Dayala, Hendny e Jéssica, por colaborarem sempre que preciso e trazerem momentos de alegria e descontração quando tudo parecia estar perdido.

Aos amigos de longa data: Marina, Diana, Mayara, Joice, Uelton, Geovanna e Yasmin, por compreenderem minha ausência e manterem o sentimento do amor recíproco, externando ainda mais a amizade e o companheirismo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pelo financiamento da pesquisa e da bolsa de estudos através do Programa Nossa Bolsa (MESTRADO).

*“Na falta de algo melhor, nunca me faltou  
coragem... Se eu soubesse antes o que sei  
agora, erraria tudo exatamente igual...”*  
Engenheiros do Hawaii - Surfando Karmas e  
DNA.



## RESUMO GERAL

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma cultura tropical, importante economicamente para o Brasil e suscetível a inúmeras doenças, como a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e a pinta-preta (*Asperisporium caricae*). Devido à possibilidade de os fitopatógenos desenvolverem resistência a fungicidas quando utilizados em larga escala, o estudo de outros métodos de controle faz-se necessário, como a utilização de compostos de origem natural e triazóis sintetizados a partir do glicerol, visto que possuem potencial antifúngico. Assim, o objetivo foi estudar produtos que poderiam substituir os agroquímicos convencionais no tratamento das doenças antracnose e pinta-preta do mamoeiro. No capítulo 1 foi avaliado o efeito dos solventes e surfactantes Tween 80® (1%, 2%, 3%, 4% e 5%), DMSO (dimetilsulfóxido) (0,25%, 0,5%, 1%, 1,5% e 2%), HLB (balanço hidrofílico-lipofílico) 4,5 (2,5%, 5%), HLB 5,5 (2,5%, 5%), HLB 6,5 (2,5%, 5%), HLB 7,5 (2,5%, 5%), Tween 80® + Span 80® (2,5%, 5%), Metanol (5%, 10%), Etanol (5%, 10%), Acetona (5%, 10%) na inibição do agente etiológico *C. gloeosporioides*. Esses solventes e surfactantes atuam solubilizando óleos essenciais e novas moléculas triazólicas, e não devem proporcionar nenhuma ação inibitória, a fim de isolar o efeito dos produtos solubilizados. Nos testes com solventes e surfactantes, apenas o Tween 80® foi estatisticamente igual à testemunha composta por meio de cultura BDA, com inibição média de 0,2% do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Utilizou-se as concentrações de 1%; 2%; 3%; 4% e 5%, enquanto os demais tratamentos proporcionaram atividade inibitória do crescimento micelial superior a 10%. No capítulo 2 são apresentados os estudos sobre a eficiência *in vivo* dos triazóis T16 e T17. Esses foram avaliados *in vitro*, anteriormente, e solubilizados com as concentrações dos solventes recomendadas no capítulo 1. Foi avaliada diariamente a severidade da doença e determinada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Os frutos tratados com T16 proporcionaram valor de AACPD igual ao controle positivo Magnate®, enquanto que o T17 igualou-se à testemunha não tratada. Porém, nos frutos tratados com T17 a doença iniciou-se aos 4,28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAAT), enquanto que o T16 aos 3,52 DAAT. Pode-se recomendar a utilização de ambos os tratamentos, devido ao T17 proporcionar maior período de pós-colheita e o T16 reduzir a severidade da doença nos frutos. No capítulo 3, avaliou-se a porcentagem de inibição da germinação de esporos (PIG) de *Asperisporium caricae* por óleos essenciais (OE) de tomilho, cravo, canela, orégano, e os componentes majoritários eugenol e carvacrol, a 1000 µg/L. Os tratamentos OE cravo, OE canela, OE orégano, eugenol e carvacrol inibiram mais de 95% da germinação dos esporos, e foram submetidos a um novo teste com as concentrações de 250, 500, 1000, 1500, 2000 µg/L. O óleo essencial de orégano e seu componente majoritário carvacrol inibiram em 50% (DE50) e 100% (DE100) a germinação de esporos de *A. caricae*, nas concentrações de 257,29 µg/L; 789,41 µg/L (OE orégano) e 166,76 µg/L; 690,74 µg/L (carvacrol), podendo ser recomendados para o controle do agente etiológico da pinta-preta do mamoeiro. Os valores de DE50 e DE100 dos demais tratamentos foram superiores aos encontrados para OE orégano e carvacrol. A utilização de outros métodos de controle de doença do mamoeiro pode ser uma alternativa para a redução da utilização de agroquímicos e opção para redução dos custos de produção.

**Palavras-Chave:** Doenças; óleos essenciais, triazóis.

## ABSTRACT

The papaya (*Carica papaya* L.) is a tropical crop, economically important for Brazil and susceptible to numerous diseases, such as anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) and black-spot (*Asperisporium caricae*). Due to the possibility of phytopathogens developing resistance to fungicides when used in large scale, the study of other control methods is necessary, such as the use of natural compounds and triazoles synthesized from glycerol, since they have antifungal potential. Thus, the objective was to study products that could replace conventional agrochemicals in the treatment of anthracnose and black-spot diseases in papaya. In Chapter 1 was evaluated the effect of solvents and Tween 80® surfactant (1%, 2%, 3%, 4% and 5%), DMSO (dimethyl sulfoxide) (0.25%, 0.5%, 1%, 1.5%), HLB (hydrophilic-lipophilic balance) 4.5 (2.5%, 5%), HLB 5.5 (2.5%, 5%), HLB 6.5 (2.5%, 5%), HLB 7.5 (2.5%, 5%), Tween 80® + Span 80® (2.5%, 5%), Methanol (5%, 10%), Ethanol (5%, 10%) Acetone (5%, 10%) in the inhibition of the etiologic agent *Colletotrichum gloeosporioides*. These solvents and surfactants act by solubilizing essential oils and new triazolic molecules, and should provide no inhibitory action in order to isolate the effect of the solubilized products. In the solvent and surfactant tests, only Tween 80® was statistically equal to the control compound composed of BDA culture medium, with 0.2% average inhibition of mycelial growth of *C. gloeosporioides*, using concentrations of 1%; 2%; 3%; 4% and 5%, whereas the other treatments provided inhibitory activity of mycelial growth superior to 10%. Chapter 2 studied the in vivo efficiency of T16 and T17 triazoles previously evaluated, in vitro, and solubilized with the solvent concentrations recommended in Chapter 1. The severity of the disease was assessed daily, and the Area Under the Disease Progression Curve (AUDPC) was determined. The fruits treated with T16 provided a value of AUDPC equal to the positive control Magnate®, whereas the T17 matched the untreated control, but in the fruits treated with T17 the disease began at 4.28 days after the application of the treatments (DAAT), whereas for T16 this occurred at 3.52 DAAT. The use of both treatments may be recommended because T17 provides longer postharvest period and T16 reduces disease severity in fruits. The percentage of inhibition of spore germination (PISG) of *Asperisporium caricae* by essential oils (EO) of thyme, clove, cinnamon, oregano, and the major components eugenol and carvacrol, at 1000 µg / L, were evaluated in Chapter 3. The treatments EO clove, EO cinnamon, EO oregano, eugenol and carvacrol inhibited above 95% of spore germination and, therefore, were submitted to a new test, in concentrations of 0, 250, 500, 1000, 1500, 2000 µg / L. Oregano essential oil and its major component carvacrol inhibited the germination of *A. caricae* spores in 50% (ED50) and 100% (ED100) with concentrations of 257.29 µg/L; 789.41 µg/L (EO oregano) and 166.76 µg /L; 690.74 µg/L (carvacrol), and may be recommended for the control of the etiologic agent of papaya black-spot. The values of ED50 and ED100 of other treatments were higher than those found for EO oregano and carvacrol. The use of other methods of controlling papaya disease may be an alternative to reduce the use of agrochemicals and an option to reduce production costs.

**Key-words:** Diseases; essential oils; triazoles.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 2

Figura 1: Esquema de obtenção dos compostos triazólicos.....	37
Figura 2: Curva de progresso da severidade da antracnose ( <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ) em frutos de mamão ( <i>Carica papaya</i> L.), tratados com fungicidas triazóis T16, T17, fungicida comercial Magnate® (controle positivo) e testemunha (controle negativo).....	42

### CAPITULO 3

Figura 1: Efeito <i>in vitro</i> dos OEs de orégano, cravo e canela, e seus componentes majoritários, eugenol e carvacrol, na inibição da germinação de esporos de <i>Asperisporium caricae</i> , nas concentrações de 0, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 µg mL <sup>-1</sup> .....	57
---	----

## LISTA DE SIGLAS

AACPD – Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença  
BDA - Batata-Dextrose-Ágar  
BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio  
CCAUE-UFES – Centro de Ciências Agrárias e Engenharia – Universidade Federal do Espírito Santo  
CM – Crescimento Micelial  
CV – Coeficiente de Variação  
DAAT – Dias Após a Aplicação dos Tratamentos  
DIC - Delineamento Inteiramente Casualizado  
DMIs - Inibidores de Reações de Demetilação  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
DE100 - Concentração Inibitória de 50% da Esporulação do Fungo  
DE50 - Concentração Inibitória de 50% da Esporulação do Fungo  
ESP – Esporulação  
GERM - Germinação  
HLB – Balanço Hidrofílico-Lipofílico  
LEMP - Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Plantas Agrícolas e Florestais  
NUDEMAFI - Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças  
OE – Óleo Essencial  
PIC – Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial  
PIG– Porcentagem de Inibição da Germinação/Esporulação  
T80+S80 –Tween 80® +Span 80

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 1

Tabela 1: Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *C. gloeosporioides* utilizando solventes/surfactantes: DMSO; Tween 80®; HLB 4,5; HLB 5,5; HLB 6,5; HLB 7,5; Tween 80® + Span 80 (T80+S80); Metanol; Etanol; Acetona, incorporados ao meio de cultura BDA.....27

### CAPITULO 2

Tabela 1: Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) antracnose em frutos de mamão (*Carica papaya* L.) tratados com triazóis T16, T17, fungicida Magnate® e testemunha não tratada.....40

### CAPITULO 3

Tabela 1: Porcentagem de inibição da germinação de esporos (PIG) de *Asperisporium caricae*, por óleos essenciais (OE) de tomilho, canela, cravo, orégano e seus componentes majoritários eugenol e carvacrol na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup> de meio de cultura ágar-água.....55

Tabela 2: Concentração inibitória de 50% (DE50) e 100% (DE100) da germinação de esporos de *Asperisporium caricae* em meio ágar-água, contendo óleos essenciais (OE) de cravo, canela e orégano e seus componentes majoritários carvacrol e eugenol, nas concentrações 250; 500; 1000; 1500; 2000 µg mL<sup>-1</sup>:.....58

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 1:.....</b>	<b>22</b>
Inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> por solventes e surfactantes.....	22
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
<b>3. RESUTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>30</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 2:.....</b>	<b>34</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
2.1. Obtenção dos triazóis .....	37
2.2. Obtenção do isolado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	37
2.3. Teste <i>in vivo</i> quanto a inibição da antracnose .....	38
2.4. Delineamento experimental e análise dos dados .....	39
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO 3:.....</b>	<b>49</b>
Inibição da germinação de esporos de <i>Asperisporium caricae</i> por óleos essenciais de tomilho, orégano, cravo, canela e os componentes majoritários eugenol e carvacrol.....	49
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
2.1. Obtenção dos isolados de <i>Asperisporium caricae</i> .....	52
2.2. Obtenção e avaliação dos OEs .....	52
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>65</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) pertence à família Caricaceae, que possui seis gêneros com 35 espécies. Seu cultivo é feito em áreas tropicais, e o Brasil, por possuir clima predominantemente tropical, caracteriza-se como um importante produtor mundial. Em ambientes com temperatura média de 25 °C, limites de 21 °C e 33 °C, e índice pluviométrico de 1.500 mm, anualmente, a cultura do mamoeiro desenvolve-se adequadamente (EMBRAPA, 2018; SERRANO; CATANNEO, 2010).

Segundo dados do IBGE (2018) o Brasil produziu 1.057.101 toneladas de mamão no ano de 2017, caracterizando-se como o segundo maior produtor do fruto a nível mundial. No país, os estados da Bahia, Espírito Santo e Ceará destacaram-se como os maiores produtores, com produção de 368.875; 311.150; e 115.525 toneladas em 2017, respectivamente. Mundialmente, a produção de mamão possuiu média de crescimento anual de 3%, no período de 2007 a 2017 (FAO, 2017).

O mamão é considerado uma fruta importante, devido à presença de antioxidantes, vitaminas, minerais e fibras, que são responsáveis por manter uma dieta saudável. Além disso, o mamão contém a enzima papaína, comumente utilizada na indústria cervejeira, farmacêutica, carnes e cosméticos. (EVANS; BALLEN; 2012)

A cultura do mamoeiro enfrenta problemas com doenças em todos os locais nos quais são produzidos. Doenças de caráter fúngico acometem essa cultura quando exposta ao patógeno, ambiente favorável e um hospedeiro suscetível. Estima-se que problemas fitossanitários são responsáveis por 25% a 40% dos danos pós-colheita de mamão, chegando a ocasionar perdas de US\$ 28 milhões aos principais países exportadores. As principais doenças fúngicas que afetam essa cultura na pós-colheita são a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e a pinta-preta (*Asperisporium caricae*) (CROPLIFE, 2019).

A antracnose (agente etiológico *Colletotrichum gloeosporioides*) é uma doença que afeta diversas culturas. Considerada a principal doença pós-colheita da cultura do mamoeiro, ocasiona lesões deprimidas, de cor acastanhada e bordas marrom-claro nos frutos. A infecção pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento do fruto, porém, fica em estado quiescente até que o fruto amadureça. A antracnose é favorecida por temperatura e umidade elevada

(ANDRADE; VIEIRA, 2016; AYÓN-REYNA et al., 2017; MORAES et al., 2013; KYING; ALI, 2015; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003).

A pinta-preta ou varíola do mamoeiro (agente etiológico *Asperisporium caricae*) é uma das doenças mais comuns na cultura do mamoeiro nas regiões tropicais, provocando danos a toda a planta. A doença se manifesta através de lesões escuras, de 1 a 6 mm, que afetam a superfície do fruto e a face abaxial da folha. A doença ocasiona uma redução da superfície fotossintética da folha, por conta das lesões necróticas. Quando a severidade da doença aumenta, as folhas senescem, ocasionando consequente desfolha. Nos frutos, embora os sintomas sejam superficiais, as lesões os tornam inadequados à comercialização, e facilitam a entrada de patógenos causadores de podridões na pós-colheita (CHIAICCHIO, 1985; MEDINA; GUTIERREZ; GARCIA, 2003; OLIVEIRA; SANTOS FILHO, 2000; REZENDE; MARTINS, 2005; SILVA et al., 2008).

Para o controle de doenças fúngicas no mamoeiro como a antracnose e a pinta-preta, utiliza-se o controle químico, através da pulverização de fungicidas comerciais. Tanto para a pinta-preta quanto para a antracnose, os produtos químicos recomendados são pertencentes aos grupos químicos: isoftalonitrila, estrobilurina, triazol, benzimidazol, alquilenobis (ditiocarbamato), imidazol e inorgânicos. Devido aos princípios ativos serem os mesmos, não é recomendado pulverização com fungicidas especificamente para antracnose em plantações comerciais, pois as medidas para conter as doenças pós-colheita são feitas ainda no campo para controle da pinta preta (AGROFIT, 2019).

Como a aplicação de químicos muitas vezes ocorre de maneira exacerbada, os patógenos tendem a desenvolver resistência aos mesmos. O mercado externo é exigente quanto à qualidade dos frutos, não permitindo lesão de qualquer espécie, e possuindo normas de tolerância mínima aos resíduos de agrotóxicos. Diante desse fato, os estudos visando métodos alternativos de controle de doença, a fim de minimizar danos e perdas, tornam-se importantes. Assim, a síntese de outros compostos triazólicos e a utilização de óleos essenciais de plantas para prevenir doenças fúngicas torna-se cada vez mais comuns (AGROFIT, 2019; ZAMBOLIM et al., 2002; MORAES; ZAMBOLIM; LIMA, 2008; ISMAN, 2000).

Os triazóis possuem uma estrutura composta por uma cadeia aromática com três átomos de nitrogênio, e podem ser obtidos somente de forma sintética. Os anéis



triazólicos podem ser encontrados como: 1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol (CREARY et al., 2012; FERGUSON et al., 1991; EL KHADEM, 1998; KRIVOPALOV; SHKURKO, 2005; MELO et al., 2006; POTTS, 1961; WANG et al. 2013; ZHOU; WANG, 2012). Esses compostos apresentam aplicabilidade em diversos setores da economia, como o farmacêutico, indústrias de agroquímicos e explosivos. Diante da sua funcionalidade, outros triazóis começaram a ter suas atividades fungicidas estudadas, como os triazóis derivados do glicerol, um subproduto da síntese do biodiesel. Verificou-se então que seu potencial antifúngico poderia ser uma alternativa para agregar valor ao glicerol (SOUZA; SEABRA, 2014; SPOLTI et al., 2014; ZHANG et al., 2015)

Diante das leis anti resíduos de agrotóxicos e da crescente preocupação da população com os efeitos que eles podem causar em longo prazo, produtos de origem natural vêm sendo estudados como possíveis alternativas para o controle de doenças e pragas. Os denominados óleos essenciais são produtos de origem natural. Sua extração normalmente ocorre através de destilação por arraste a vapor de material vegetal. Os óleos essenciais são metabólitos secundários que desempenham funções relacionadas à interação das plantas com o ambiente vegetal, como a defesa de plantas contra patógenos, pragas ou herbívoros. Esses compostos são utilizados como atraentes, têm alelopáticos, fotoprotetores ou funções de colheita. A utilização de óleos essenciais de plantas atualmente é aplicada em diversos setores, como o alimentício, farmacêutico, medicina alternativa e terapias naturais (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; ISMAN, 2000; NELSON; COX, 2015; SHELUDKO, 2010).

A atividade dos óleos essenciais contra fungos fitopatogênicos foi descrita por diversos autores, como Rozwalka et al. (2008), que reportou a utilização de óleo essencial de cravo a 10% contra *Glomerella singulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, em frutos de goiaba. Kishore; Pand; Harish (2007) avaliaram a atividade inibitória da germinação de esporos e constataram que óleo de canela, citral e óleo de cravo inibiram acima de 90% os fitopatógenos *Cercospora arachidicola*, *Phaeoisariopsis personata* e *Puccinia arachidis*, quando utilizado a 0,01% v/v. Os autores afirmam ainda que os óleos que apresentaram características antifúngicas atuam reduzindo o crescimento micelial e induzem a quebra e a evacuação citoplasmática em fungos.

Com a suscetibilidade do mamão a doenças fúngicas e sua importância comercial, aliado à resistência de fitopatógenos a certos fungicidas utilizados comercialmente e à fiscalização de resíduos de agroquímicos em frutos, faz-se necessário a realização de estudos que busquem meios alternativos aos agroquímicos convencionais para o controle de doença de plantas. A utilização de outros triazóis sintetizados, que se diferenciam quanto a cadeia lateral, e a utilização de óleos essenciais e seus componentes majoritários podem se apresentar viáveis no controle da antracnose e da pinta-preta do mamão. Óleos essenciais e triazóis possuem baixa solubilidade em água, fazendo-se necessário a utilização de solventes e surfactantes como solubilizantes desses compostos em testes microbiológicos. Para não interferir na avaliação do efeito antimicrobiano de produtos alternativos aos agroquímicos convencionais, os solventes e surfactantes não devem proporcionar inibição microbiológica (BUENO, 2008; KNOBLOCH et al., 1989; ZHANG et al., 1999).

Assim, o objetivo com este estudo foi avaliar a atividade inibitória do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* utilizando diferentes solventes e surfactantes, a fim de propor o melhor solubilizante que não interfira na eficiência antifúngica de defensivos alternativos, como dos novos triazóis sintetizados a partir do glicerol, testados no controle da antracnose em frutos de mamão. Avaliou-se também a inibição da germinação de esporos de *Asperisporium caricae* utilizando óleos essenciais de tomilho, orégano, cravo, canela, e os componentes majoritários: eugenol e carvacrol.

## REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Consulta de pragas, Brasília, DF, 2019. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso: 15 fev. 2019
- ANDRADE, W. P.; VIEIRA, G. H. C. Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose *in vitro* e em frutos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. a00101s1, p. 367-372, 2016.
- AYÓN-REYNA, L. E. et al. Application of a hydrothermal-calcium chloride treatment to inhibit postharvest anthracnose development in papaya. **Postharvest Biology and Technology**, v. 124, p. 85-90, 2017.
- BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- CHIACCHIO, F. P. B. Doenças em fruteiras: mamão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 123, p. 27-30, 1985.
- CREARY, X. et al. Method for assigning structure of 1, 2, 3-triazoles. **The Journal of organic chemistry**, v. 77, n. 19, p. 8756-8761, 2012.
- CROP LIFE LATIN AMERICA. **A Antracnose, uma doença limitante para a produção de mamão**. Disponível em: <https://www.croplifela.org/pt/pragas/lista-do-pragas/antracnose>. Acesso: 22 jan. 2019.
- EVANS, E. A.; BALLEEN, F. H. An overview of global papaya production, trade, and consumption. **Gainesville: University of Florida**, 2012.
- EL KHADEM, H. S. The mechanism of saccharide osotriazole formation. **Carbohydrate research**, v. 313, n. 3-4, p. 255-257, 1998.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Mamão**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao>>. Acesso em: 03 nov. 2018.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT domains: crops, Washington, USA, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Acesso: 03 nov. 2018.
- FERGUSON, G. et al. Diversity of reaction of azoalkenes in cycloadditions. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 12, p. 3361-3369, 1991.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of applied microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2018. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>>. Acesso em: 15 fev. 2019

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop protection**, v. 19, n. 8-10, p. 603-608, 2000.

KISHORE, G. K.; PANDE, S.; HARISH, S. Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. **Plant Disease**, v. 91, n. 4, p. 375-379, 2007.

KNOBLOCH, K. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, n. 3, p. 119-128, 1989.

KRIVOPALOV, V. P.; SHKURKO, O. P. 1, 2, 3-Triazole and its derivatives. Development of methods for the formation of the triazole ring. **Russian chemical reviews**, v. 74, n. 4, p. 339-379, 2005.

KYING, M.; ALI, A. Postharvest biology and technology antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 113-119, 2015.

MEDINA, J. C.; GUTIÉRREZ, G. V.; GARCÍA, H. S. Pawpaw: post-harvest operation. **Organisation: Instituto Tecnológico de Veracruz (ITV)**, p. 70, 2003.

MELO, J. O. F. et al. 1, 2, 3-triazolic heterocycles: history, preparations, applications and pharmacological activities. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

MORAES, S. R. G.; TANAKA, F. A. O.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 657-664, 2013.

MORAES, W. S.; ZAMBOLIM, L.; LIMA, J. D. Quimioterapia de banana 'Prata anã' no controle de podridões pós-colheita. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 79-84, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 2015.

OLIVEIRA, A. A. R.; SANTOS FILHO, H. P. Doenças. In: RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. (Org.) **Mamão: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 37-46.

POTTS, K. T. The Chemistry of 1, 2, 4-Triazoles. **Chemical Reviews**, v. 61, n. 2, p. 87-127, 1961.

REZENDE, J. A. M.; MARTINS, M. C. Doenças do mamoeiro. In: KIMATTI, J.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.

(Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p.435-444, 2005.

ROZWALKA, L. C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, 2008.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F.. Papaya culture in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, 2010.

SHELUDKO, Y. V. Recent advances in plant biotechnology and genetic engineering for production of secondary metabolites. **Cytology and genetics**, v. 44, n. 1, p. 52-60, 2010.

SILVA, M. B. et al. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 3, p. 57-60, 2008.

SOUZA, S. P.; SEABRA, J. E. A. Integrated production of sugarcane ethanol and soybean biodiesel: environmental and economic implications of fossil diesel displacement. **Energy conversion and management**, v. 87, p. 1170-1179, 2014.

SPOLTI, P. et al. Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. **Plant Disease**, v. 98, n. 5, p. 607-613, 2014.

VENTURA, J. A.; COSTA, A.; TATAGIBA, J. S. Manejo das doenças do mamoeiro. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. **A cultura do mamoeiro: Tecnologias de produção**. Vitória: Incaper, 2003. p. 230-308.

WANG, K. et al. 1, 2, 3-Triazoles: Gas Phase Properties. **The Journal of organic chemistry**, v. 78, n. 14, p. 7249-7258, 2013.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VENTURA, J.A.; VALE, F. X. R. **Controle de doenças pós-colheita de frutas tropicais**. In: Zambolim, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. cap. 12, p.443-511.

ZHANG, J. et al. Surface properties of emulsan-analogs. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 74, n. 8, p. 759-765, 1999.

ZHANG, Y. et al. Application of glycerol as a foliar spray activates the defence response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*. **Molecular plant pathology**, v. 16, n. 1, p. 27-37, 2015.

ZHOU, C.; WANG, Y. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 2, p. 239-280, 2012.

## **CAPÍTULO 1:**

Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* por solventes e surfactantes

### **RESUMO:**

A antracnose pode ser considerada a principal doença pós-colheita do mamão. Assim, o estudo de métodos alternativos aos agroquímicos convencionais no controle de doenças faz-se necessário devido à indução de resistência dos patógenos que esses compostos podem causar, e às leis de resíduos de agrotóxicos mínimos. Compostos triazólicos e produtos de origem natural podem apresentar baixa solubilidade em água, fazendo-se necessário utilizar solventes e surfactantes para solubilizar e estabilizar o princípio ativo desses compostos em testes microbiológicos. Porém, solventes e surfactantes não devem proporcionar inibição microbiológica, a fim de não interferir na avaliação do efeito antimicrobiano dos ingredientes ativos. Portanto, o objetivo foi avaliar o efeito inibitório *in vitro* de solventes e surfactantes no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Para a realização do experimento, foram utilizadas diferentes concentrações de Tween 80® (1%, 2%, 3%, 4% e 5%), DMSO (dimetilsulfóxido) (0,25%, 0,5%, 1%, 1,5%), HLB (balanço hidrofílico-lipofílico) 4,5 (2,5%, 5%), HLB 5,5 (2,5%, 5%), HLB 6,5 (2,5%, 5%), HLB 7,5 (2,5%, 5%), Tween 80® + Span 80 (2,5%, 5%), Metanol (5%, 10%), Etanol (5%, 10%), Acetona (5%, 10%). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 26 tratamentos e uma testemunha composta por meio de cultura BDA. Foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram incorporados ao meio de cultura BDA e a avaliação foi realizada após a testemunha composta somente por meio de cultura BDA atingir toda a superfície da placa de Petri de 6 cm de diâmetro. Realizou-se a medição do crescimento micelial e avaliou-se a porcentagem de inibição (PIC). Os valores de porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foram submetidos à análise de variância e foi utilizado o teste de médias de Tukey, a 5% de probabilidade. O tratamento Tween 80®, em concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5% foi estatisticamente igual à testemunha, inibindo apenas 0,2% do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Os demais tratamentos diferiram-se estatisticamente da testemunha em todas as concentrações testadas. O DMSO inibiu entre 10% e 40% o crescimento micelial do agente etiológico da antracnose. O metanol, etanol e acetona, nas duas concentrações testadas (5% e 10%), inibiram 100% o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Os outros tratamentos utilizados (HLB, T80+S80) foram responsáveis por inibir entre 20% e 40% o crescimento micelial do agente etiológico nas concentrações testadas. Portanto, para trabalhos que visam estudar a atividade antifúngica de triazóis, óleos e componentes majoritários, recomenda-se utilizar concentrações de 1% a 5% de Tween 80® como solvente.

**Palavras-Chave:** Antracnose; TWEEN 80®; DMSO; SPAN 80; HLB.

## 1. INTRODUÇÃO

O mamão é uma das frutas mais consumidas e comercializadas no mundo. A cultura é suscetível à doenças, proporcionando danos e perdas, principalmente na pós-colheita do fruto. A antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) é uma das doenças que afeta a cultura do mamoeiro, ocasionando lesões deprimidas, circulares e de cor acastanhada nos frutos. Os sintomas da antracnose normalmente manifestam-se após o amadurecimento do fruto, favorecido por temperaturas próximas a 27 °C e umidade relativa superior a 80%. (EMBRAPA, 2018; SERRANO; CATANNEO, 2010; ANDRADE; VIEIRA, 2016; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003).

Para o manejo da antracnose em pós-colheita do mamão, na maioria dos casos, são utilizados defensivos químicos. Em 2019, 38 defensivos que possuem seus princípios ativos pertencentes aos grupos: isoftalonitrila, estrobilurina, triazol, benzimidazol, alquilenobis (ditiocarbamato), imidazol e inorgânicos (AGROFIT, 2019) estão registrados no Brasil para o controle da doença. Porém, a utilização inadequada e irracional de agroquímicos convencionais pode ocasionar a seleção de populações do patógeno com resistência aos defensivos (AGROFIT, 2019 AYÓN-REYNA et al., 2017; MORAES; TANAKA; MASSOLA JUNIOR, 2013; KYING; ALI, 2015).

Logo, estudos que visem a utilização de métodos alternativos aos agroquímicos convencionais estão sendo realizados. Como exemplo, tem-se a utilização de triazóis derivados de glicerol, e óleos essenciais de plantas (BASSYOUNI et al., 2012; COMBRINCK; REGNIER; KAMATOU, 2011; COSTA et al., 2017; SANTOS et al., 2017). Todavia, para utilização desses produtos alternativos visando o controle fitossanitário, faz-se necessários o uso de solventes e surfactantes para o preparo das soluções desses compostos, já que apresentam baixa solubilidade em água. Esses solventes e surfactantes não devem proporcionar inibição microbiológica, a fim de não interferir na avaliação do efeito antimicrobiano dos compostos (BUENO, 2008; KNOBLOCH et al., 1989; ZHANG et al., 1999). Sendo assim, o objetivo com esse estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de diferentes solventes e surfactantes quanto à inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas Agrícolas e Florestais (LEMP) do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), situado na cidade de Alegre/ES (20°45' S, 41°29' W).

O isolamento do patógeno *C. gloeosporioides* foi realizado a partir de frutos de mamão com sintomas característicos de antracnose. Procedeu-se a técnica de isolamento direto (ALFENAS, 2007), em que estruturas do patógeno foram transferidas para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). As placas foram lacradas e mantidas em câmeras tipo BOD, com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente ao crescimento micelial do patógeno, esse foi repicado para novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA, para a obtenção da cultura pura. Foram realizadas análises para identificação do patógeno, através da observação microscópica em lâminas preparadas com lactofenol, nas quais foram observadas as estruturas reprodutivas do fungo e confirmada sua identidade.

O experimento foi realizado avaliando-se Tween 80®; DMSO, HLB 4,5; HLB 5,5; HLB 6,5; HLB 7,5; Tween 80® + Span 80 (T80+S80); Metanol; Etanol; Acetona, utilizando diferentes concentrações desses compostos: Tween 80® (1%, 2%, 3%, 4% e 5%); DMSO (dimetilsulfóxido) (0,25%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%); HLB 4,5 (2,5%, 5%); HLB 5,5 (2,5%, 5%); HLB 6,5 (2,5%, 5%); HLB 7,5 (2,5%, 5%); Tween 80® + Span 80 (2,5%, 5%); Metanol (5%, 10%); Etanol (5%, 10%); Acetona (5%, 10%).

Os solventes e surfactantes, de acordo com cada tratamento, foram homogeneizados em meio de cultura BDA fundente (45°C a 50°C) para obtenção das concentrações de teste e dispostos em placas de poliestireno de 6 cm de diâmetro. Posteriormente, discos de micélio do fungo, com 6 mm de diâmetro, foram depositados na região central das placas, as quais foram embaladas e colocadas em câmara de crescimento tipo BOD, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação do crescimento micelial foi realizada quando a colônia fúngica da testemunha atingiu toda a superfície do meio. Os valores de crescimento micelial



foram obtidos através da medição do diâmetro em dois sentidos, perpendicularmente, com o auxílio de uma régua graduada em milímetros. De posse dos dados, foi realizado o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), utilizando a fórmula proposta por Edgington; Khew; Barron (1971):

$$PIC = \frac{CM_{\text{testemunha}} - CM_{\text{tratamento}}}{CM_{\text{testemunha}}} \times 100$$

PIC = porcentagem de inibição de crescimento micelial

$CM_{\text{testemunha}}$  = crescimento micelial da testemunha

$CM_{\text{tratamento}}$  = crescimento micelial do tratamento

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 26 tratamentos, conforme descrito anteriormente, e adicionalmente utilizou-se uma testemunha composta somente por meio de cultura BDA. Foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento.

Os dados de PIC obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2018).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas avaliações com Tween 80®, todas as concentrações testadas foram estatisticamente iguais, inibindo 0,2% o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Quanto às concentrações de DMSO, houve índices de inibição do crescimento do fungo acima de 10%, em todas as concentrações testadas. Etanol, metanol e acetona, nas concentrações de 5% e 10%, inibiram completamente o desenvolvimento do fungo (Tabela 1). A mistura dos surfactantes Tween 80® e SPAN 80, quando testada na concentração de 2,5% e 5%, inibiu em 35% e 42% a porcentagem o desenvolvimento do fungo, respectivamente. Enquanto as soluções de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), utilizadas nas concentrações de 2,5% e 5%, foram responsáveis por inibir quase 40% do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*.

Tabela 1: Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *C. gloeosporioides* utilizando solventes/surfactantes: DMSO; Tween 80®; HLB 4,5; HLB 5,5; HLB 6,5; HLB 7,5; Tween 80® + Span 80 (T80+S80); Metanol; Etanol; Acetona, incorporados ao meio de cultura BDA:

Tratamento	Concentração (%)	PIC (%)
Testemunha	0	0 h
DMSO	0,25	10,23 g
DMSO	0,50	17,60 f
DMSO	1	21,96 e
DMSO	1,50	32,44 c
DMSO	2	41,62 b
TWEEN 80®	1	0 h
TWEEN 80®	2	0 h
TWEEN 80®	3	0 h
TWEEN 80®	4	0,40 h
TWEEN 80®	5	0,78 h
HLB 4,5	2,50	22,03 e
HLB 4,5	5	27,83 d
HLB 5,5	2,50	34,20 c
HLB 5,5	5	36,30 c
HLB 6,5	2,50	38,70 b
HLB 6,5	5	39,78 b
HLB 7,5	2,50	38,04 b
HLB 7,5	5	34,78 c
T80 + S80	2,50	35,65 c
T80 + S80	5	41,74 b
Metanol	5	100 a
Metanol	10	100 a
Etanol	5	100 a
Etanol	10	100 a
Acetona	5	100 a
Acetona	10	100 a
CV* (%)	7,98	

\*Coeficiente de variação.

As medias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si por teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p>0,05$ ).

Para testes em que se busca a eficiência isolada de cada princípio ativo, o estudo preliminar dos solventes é de fundamental importância. Comercialmente, a utilização de solventes que inibem o crescimento micelial é benéfico, já que se soma a ação do agente químico principal. Porém, para avaliar a eficácia do princípio ativo é necessário garantir o isolamento de seu efeito, testando previamente os solventes/surfactantes e componentes adicionais das soluções, garantindo que não haja interferência no desenvolvimento do agente etiológico. A verificação da fitotoxidez de solventes e surfactantes nas plantas também deve ser considerada, pois esses não devem proporcionar nenhum efeito adicional.

Avaliações quanto à inibição do crescimento micelial e os resultados obtidos neste trabalho facilitam a realização de trabalhos futuros, pois garantirão que a eficácia do tratamento se dê através do princípio ativo utilizado. Ao caracterizar a sensibilidade a fungicidas de cinco espécies de *Colletotrichum* (*C. asianum*, *C. dianesii*, *C. fruticola*, *C. karstii*, *C. tropicale*) associados à antracnose em frutos de mangueira no Nordeste do Brasil, Lima (2013) sugeriu a preparação da solução de produtos comerciais com DMSO, de forma que a concentração final para os testes *in vitro* fosse 0,1% v/v. Tal fato comprova que concentrações de DMSO acima desse valor (0,1%), como as deste trabalho, influenciam diretamente no desenvolvimento da espécie *Colletotrichum*. Concentrações superiores a 0,25% de DMSO foram suficientes para inibir em 10% o desenvolvimento de *C. gloeosporioides*.

Em testes utilizando Tween 80® como emulsificante de óleos essenciais, Nascimento (2008) constatou que houve diferença significativa no crescimento micelial de *A. alternata* utilizando concentrações de 0,025% e 0,5% de Tween 80®, o que Gomes-Lopez et al. (2005), Takarada et al. (2004) e Hood; Wilkinson; Cavanagh (2003) atribuem a interação existente entre o emulsificante, o microorganismo e os produtos utilizados (princípios ativos). Takarada et al. (2004) e Hood; Wilkinson; Cavanagh (2003) afirmaram ainda que o Tween pode impossibilitar o contato dos princípios ativos do OE ou triazól com o fungo, devido à alteração da permeabilidade da membrana celular ocasionada pelo emulsificante. Para *C. gloeosporioides* isso não ocorre, já que concentrações de 1% a 5% de Tween 80® não inibiram o desenvolvimento do agente etiológico. Sandscar; Magalhães (1994) também relacionam a sensibilidade de microorganismos a concentrações de solubilizantes, já que a sensibilidade do fungo aumenta com o crescimento da concentração dos

produtos utilizados. Por isso, faz-se necessário essa avaliação de diferentes concentrações de solubilizantes.

Como citado por Nascimento et al. (2008), Gomes-Lopez et al. (2005), Takarada et al. (2004) e Hood et al. (2003), o Tween influencia no desenvolvimento de diversos microorganismos, o que não ocorreu com o *C. gloeosporioides* nas concentrações utilizadas no presente estudo. A ação inibitória de solventes e surfactantes difere-se de acordo com o fungo. Como exposto por Almeida (2015), que em ensaios microbiológicos utilizando OEs preparou soluções contendo 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) e 0,5%, Tween 80® e essas concentrações não interferiram no desenvolvimento de *Botrytis cinerea*. Em ensaios com *C. gloeosporioides*, a concentração de 2% de DMSO foi responsável pela inibição de 41,62% do crescimento micelial do fungo, comprovando a maior sensibilidade deste ao solvente DMSO.

Os demais surfactantes analisados foram selecionados a partir de características de polaridade semelhantes a compostos triazólicos e derivados de plantas, que possuem baixa solubilidade em água (MINIYAR et al., 2017; INOUE et al., 2005). Chen (2014), para o controle de *C. lagenarium* e *B. cinerea*, utilizando compostos triazólicos, utilizou concentração de 0,5% de etanol, que ao ser misturado em meio de cultura obteve concentração final de 0,02%. Nessa concentração, o etanol não influenciou no desenvolvimento dos patógenos nos testes realizados por Chen (2014), confirmando que concentrações superiores de etanol às avaliadas (5% e 10%) possuem atividade fungicida.

Portanto, a partir da realização dos testes com solventes e surfactantes realizados no presente trabalho, constatou-se que o Tween 80®, em concentrações de 1%; 2%; 3%; 4% e 5%, pode ser utilizado em testes microbiológicos de *C. gloeosporioides*, por não interferir no crescimento micelial do patógeno. Sugere-se ainda a realização de ensaios microbiológicos com os solventes e surfactantes deste trabalho em concentrações inferiores.

#### 4. CONCLUSÕES

O Tween 80®, nas concentrações de 1%; 2%; 3%; 4% e 5%, pode ser indicado para solubilizar compostos em testes microbiológicos, pois não inibiu o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Os demais tratamentos, DMSO (dimetilsulfóxido) (0,25%, 0,5%, 1%, 1,5%), HLB 4,5 (2,5%, 5%), HLB 5,5 (2,5%, 5%), HLB 6,5 (2,5%, 5%), HLB 7,5 (2,5%, 5%), Tween 80® + Span 80 (2,5%, 5%), Metanol (5%, 10%), Etanol (5%, 10%), Acetona (5%, 10%), apresentaram atividade inibitória no crescimento micelial nas concentrações testadas.

## 5. REFERÊNCIAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Consulta de pragas, Brasília, DF, 2019. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso: 15 fev. 2019

ALFENAS, A. C. **Métodos em fitopatologia**. UFV, 2007.

ALMEIDA, G. S. **Potencial de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos em pós-colheita de morango**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ANDRADE, W. P.; VIEIRA, G. H. C. Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose in vitro e em frutos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. a00101s1, p. 367-372, 2016.

AYÓN-REYNA, L. E. et al. Application of a hydrothermal-calcium chloride treatment to inhibit postharvest anthracnose development in papaya. **Postharvest Biology and Technology**, v. 124, p. 85-90, 2017.

BASSYOUNI, F. A. et al. Antimicrobial, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of triazole, pyrazole, oxadiazine, oxadiazole, and sugar hydrazone-5-nitroindoline-2-one derivatives and a study of their computational chemistry (part II). **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 11, n. 2, p. 136, 2012.

BUENO, S. M.. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.

CHEN, G. et al. Synthesis and antifungal activity of benzamidine derivatives carrying 1, 2, 3-triazole moieties. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5674-5691, 2014.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 344-349, 2011.

COSTA, A. V. et al. Synthesis of Novel Glycerol-Derived 1, 2, 3-Triazoles and Evaluation of Their Fungicide, Phytotoxic and Cytotoxic Activities. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1666, 2017.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Mamão. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT domains: crops, Washington, USA, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Acesso: 03 nov. 2018.

GOMEZ-LOPEZ, A. et al. Analysis of the influence of Tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1251-1255, 2005.

HOOD, J. R.; WILKINSON, M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 6, p. 428-433, 2003.

INOUE, Y. et al. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1770-1774, 2005.

KNOBLOCH, K. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, n. 3, p. 119-128, 1989.

KYING, M.; ALI, A. Postharvest biology and technology antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 113-119, 2015.

LIMA, N. B. **Etiologia e epidemiologia das espécies de *Colletotrichum* relacionadas com a antracnose em frutos de mangueira no nordeste brasileiro**. 2013 80 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MINIYAR, P. B. et al. Triazole hybrids as new type of anti-fungal agents. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 295-299, 2017.

MORAES, S. R. I G.; TANAKA, F. A. O.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 657-664, 2013.

NASCIMENTO, F. R. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, 2008.

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

SANDSKÄR, B.; MAGALHÃES, B. Cryopreservation of *Zoopthora radicans* (Zygomycetes, Entomophthorales) in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 31, n. 2, p. 206-213, 1994.



SANTOS, T. L. et al. Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. **Ciência Rural**, v. 47, n. 5, 2017.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. Papaya culture in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, 2010.

TAKARADA, K. et al. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 1, p. 61-64, 2004.

VENTURA, J. A.; COSTA, A.; TATAGIBA, J. S. Manejo das doenças do mamoeiro. In: In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. **A cultura do mamoeiro**: Tecnologias de produção. Vitória: Incaper, 2003. p.230-308.

ZHANG, J. et al. Surface properties of emulsan-analogs. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 74, n. 8, p. 759-765, 1999.

## CAPÍTULO 2:

Eficiência de triazóis quanto ao controle da antracnose em mamão

### RESUMO:

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é suscetível a inúmeras doenças. A antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) pode ser considerada uma das principais, sendo responsável por danos e perdas pós-colheita. Essa doença pode ser controlada com o uso de fungicidas, sendo os mais eficientes pertencentes ao grupo químico dos triazóis e imidazóis. Quando utilizados indiscriminadamente, esses fungicidas podem proporcionar seleção de populações do patógeno com resistência. Assim, estudos que propõem a utilização de outros compostos eficientes no controle da doença fazem-se necessários. O objetivo foi avaliar a eficiência de triazóis, denominados T16 e T17 quanto ao controle da antracnose em frutos de mamão. Para obtenção do inóculo, foi realizado o isolamento direto de *C. gloeosporioides* e calibrada uma suspensão de esporos à concentração de  $10^5$  conídios/mL. Em seguida, realizou-se a pulverização da suspensão de esporos sobre os frutos, até o ponto de escorrimento, quatro dias antes da colheita. No momento da colheita foram selecionados os frutos que apresentavam estágio I de maturação. Em laboratório, realizou-se uma segunda seleção dos frutos para fins de padronização e minimização de danos mecânicos. Em seguida, os frutos foram submetidos aos tratamentos T16 e T17. Adicionalmente, utilizou-se o produto comercial Magnate® (padrão comercial), utilizado para os tratamentos pós-colheita em frutos de mamão como controle positivo. Como controle negativo, utilizou-se uma testemunha inoculada que não recebeu nenhum tratamento. Os tratamentos foram aplicados com pulverizador manual até o ponto de escorrimento. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x7), com cinco repetições por tratamento e quatro frutos por parcela experimental. Diariamente foi avaliada a severidade da doença por sete dias, utilizando escala diagramática\*, a fim de plotar a curva de progresso da doença e determinar a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Os valores de AACPD nos frutos de mamão tratados com as moléculas de T16 e T17 foram de 15 e 21,9, respectivamente, sendo o tratamento T16 igual estatisticamente ao controle positivo, enquanto que o tratamento T17 igualou-se ao controle negativo. Ao plotar a curva de progresso da doença, observou-se o aumento da severidade da antracnose em todos os tratamentos. A partir dos modelos de regressão ajustados, determinou-se que nos frutos tratados com T17 a doença iniciou-se aos 4,28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAAT), posteriormente aos demais, em que os valores mínimos de severidade ocorreram aos 3,46; 3,52 e 3,33 DAAT, para testemunha; T16 e Magnate®, respectivamente. Constatou-se então que o tratamento T16 proporcionou maior preservação dos frutos de mamão, porém o tratamento T17 pode ser associado ao aumento do período de pós-colheita, podendo ser recomendados, desde que outras práticas de manejo da doença sejam realizadas.

**Palavras-Chave:** *Colletotrichum gloeosporioides*; controle químico; doenças pós-colheita.

## 1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Caricapapaya L.*) pertence à família Caricaceae, com seis gêneros e 35 espécies. Seu cultivo é feito em áreas tropicais, e o Brasil, por possuir um clima predominantemente tropical, caracteriza-se como um importante produtor mundial (EMBRAPA, 2018). Segundo dados do IBGE (2018), o Brasil apresentou uma produção de 1.057.101 toneladas de mamão no ano de 2017, caracterizando-se como o segundo maior produtor do fruto a nível mundial. No país, os estados da Bahia, Espírito Santo e Ceará destacam-se como os maiores produtores, com produção de 368.875; 311.150; e 115.525 toneladas, respectivamente.

A cultura do mamoeiro é suscetível a inúmeras doenças. Dentre elas, destaca-se a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). Essa doença proporciona danos na pós-colheita e perdas aos produtores. Os sintomas são lesões circulares, deprimidas, acastanhadas e de borda marrom-claro nos frutos (AGROFIT, 2019; REZENDE; MARTINS, 2005). Os sintomas manifestam-se após o amadurecimento, e a doença é favorecida por temperatura e umidade relativa elevada. Para o controle da antracnose são utilizados defensivos químicos (AGROFIT, 2019; AYÓN-REYNA et al., 2017; MORAES; TANAKA; MASSOLA, 2013; KYING; ALI, 2015).

Os fungicidas que apresentam maior eficácia no controle da antracnose pertencem ao grupo dos triazóis e dos imidazóis (AGROFIT, 2019; TORRES-CALZADA et al., 2013). Os triazóis possuem uma estrutura composta por uma cadeia aromática com três átomos de nitrogênio, e podem ser obtidos somente de forma sintética. Os anéis triazólicos podem ser encontrados como: 1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol, sendo subclassificados em vicinais (1,2,3-triazol) ou simétricos (1,2,4-triazol) (CREARY et al., 2012; FERGUSON et al, 1991; EL KHADEM, 1998; KRIVOPALOV; SHKURKO, 2005; MELO et al., 2006; POTTS, 1961; WANG et al., 2013; ZHOU; WANG, 2012). Esses compostos apresentam aplicabilidade em diversos setores da economia, como o farmacêutico, indústrias de agroquímicos e explosivos. Diante da sua funcionalidade, outros triazóis começaram a ter suas atividades fungicidas estudadas, como os triazóis derivados do glicerol, um subproduto da síntese do biodiesel. Assim, verificou-se que seu potencial antifúngico poderia ser uma alternativa para agregar valor ao glicerol (SOUZA; SEABRA, 2014; SPOLTI et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

Os triazóis e os imidazóis são fungicidas inibidores de reações de demetilação do C14 (DMIs) (FRAC, 2018). Eles atuam como inibidores da biossíntese do ergosterol na célula dos fungos. Os esteróis são responsáveis pelo regulamento das propriedades físicas da membrana plasmática e são importantes no metabolismo aeróbico e na regulação do ciclo celular. Em fungos, a biossíntese do esterol forma o ergosterol, responsável por manter a função e a estrutura da membrana plasmática, sendo importante para o crescimento, desenvolvimento e proliferação do fungo (FRAC, 2018; FRANÇA et al., 2014).

Apesar da eficiência antifúngica dos triazóis, de acordo com Zambolim et al. (2002), patógenos podem desenvolver resistência a fungicidas, quando esses são utilizados indiscriminadamente. Portanto, a síntese de outros compostos triazólicos foi proposta por Costa et al. (2017), Bassyouni et al. (2014), Desai et al. (2013); Pochampalli et al. (2012); Singh; Pandey; Sengupta (2012), tornando-se uma alternativa para o controle de fungos. A utilização do glicerol, subproduto da síntese do biodiesel, como material de partida para a síntese de compostos triazólicos é proposta por Costa et al. (2017), que transforma esse resíduo e otimiza seu uso.

A atividade fungicida de 17 triazóis, derivados de glicerol, foi avaliada *in vitro* por Gomes (2014) no desenvolvimento de *C. gloesporioides*. Os denominados triazóis T16 e T17 inibiram completamente no crescimento micelial do fungo na concentração de 1000 µg/mL. Portanto, o objetivo com este estudo foi avaliar a eficiência dos triazóis T16 e T17 obtidos a partir do glicerol, como fungicidas para controlar a antracnose em frutos de mamão.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção dos triazóis

Os derivados triazólicos foram obtidos através da reação proposta por Kolb; Finn; Sharpless (2001), da cicloadição de azida/alcino catalisada com cobre (I) (CuAAC), também conhecida como “reação Click”, utilizando o glicerol como material de partida (figura 1).

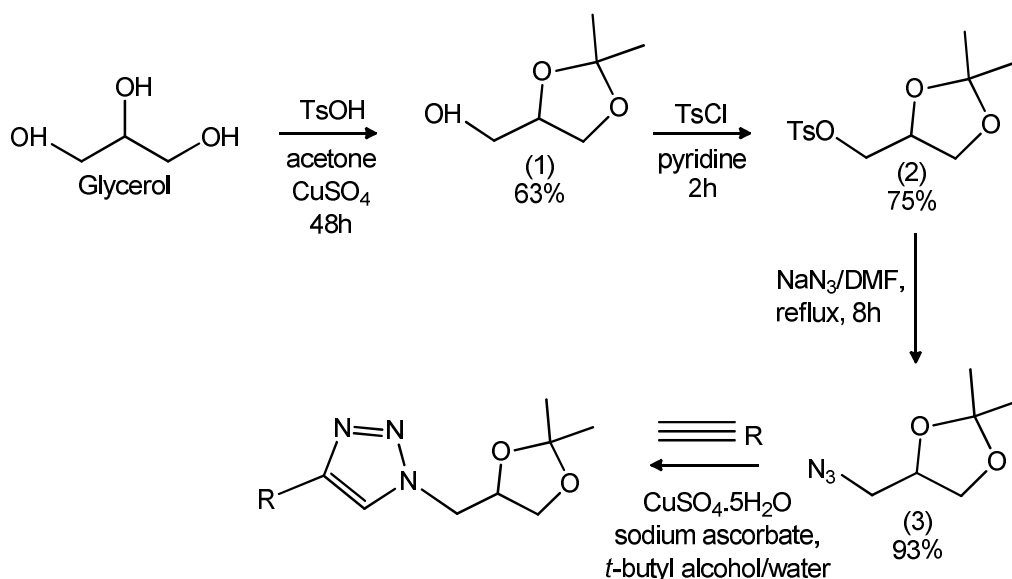


Figura 1: Esquema de obtenção dos compostos triazólicos. (COSTA et al., 2017)

Esses compostos foram caracterizados através de espectroscopia de Infravermelho, massas e ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e foi observada a presença de um anel de cinco membros, heterocíclico, aromático, contendo três átomos de nitrogênio, nas respectivas posições 1, 2 e 3 (COSTA et al., 2017).

### 2.2. Obtenção do isolado de *Colletotrichum gloeosporioides*

Para a obtenção do isolado do patógeno, frutos de mamão foram coletados provenientes de plantas localizadas na área experimental da Universidade Federal do Espírito Santo, com sintomas característicos de antracnose, e transportados para

o Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas Agrícolas e Florestais (LEMP) do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), situado na cidade de Alegre/ES (20°45' S, 41°29' W), onde foi realizado o isolamento do fungo, *Colletotrichum gloeosporioides*.

Utilizou-se a técnica de isolamento direto. As estruturas do patógeno (esporos e hifas) presentes nas áreas lesionadas do fruto foram transferidas para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA (ágar-batata-dextrose). Essas placas foram lacradas e mantidas em Câmaras tipo BOD, à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Após crescimento micelial, o fungo foi, posteriormente, repicado para novas placas de Petri, com meio de cultura BDA, para a obtenção da cultura pura. Para identificação do patógeno utilizou-se de observação microscópica em lâminas, preparadas com lactofenol, nas quais foram visualizadas as estruturas reprodutivas do fungo e confirmada a identidade de *C. gloeosporioides*.

Após obtenção do *isolado fúngico* em meio de cultura BDA, discos de micélio foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura V8®, utilizado para obtenção de um maior número de esporos para realização dos testes.

### 2.3. Teste *in vivo* quanto a inibição da antracnose

Foram selecionados e numerados frutos colhidos em plantas localizadas na área comercial da área experimental do CCAUE-UFES que apresentavam estágio de maturação próxima a I, ou seja, frutos cuja perspectiva de colheita fosse o mais breve possível. Em seguida, foram pulverizados com suspensão ( $10^5$  conídios/mL) de esporos de *C. gloeosporioides*, utilizando um pulverizador manual com vazão de 0,1714 L/min, até atingir o ponto de escorrimento. Passados 96 horas após a inoculação, os frutos que atingiram o estágio de maturação 1 (frutos com até 15% da superfície amarela) foram colhidos e levados para o Laboratório de Análises Vegetais do CCAUE-UFES. No laboratório, os frutos foram novamente selecionados para a padronização quanto a cor, tamanho e redução de possíveis danos mecânicos e, posteriormente, dividiu-se os lotes para cada tratamento.

Foram utilizadas cinco repetições, compostas por quatro frutos por unidade experimental. Os tratamentos T16 e T17 e o controle positivo, Magnate® (imazalil: 1000 µg/mL) (produto comercial utilizado para pós-colheita), foram pulverizados em concentração de 1000 µg/mL (concentração recomendada para aplicação do produto comercial) até o ponto de escorrimento. Como controle negativo, utilizou-se uma testemunha exposta ao inóculo que não recebeu nenhum tratamento.

Os frutos inoculados e tratados foram acondicionados à temperatura de 25°C por um período de nove dias após aplicação dos tratamentos e avaliados diariamente a partir do terceiro dia (quando alguns frutos apresentaram os primeiros sintomas da doença) quanto à severidade. A área lesionada foi quantificada com auxílio da escala diagramática proposta por Zavala León e Alejo (2011). Os valores de severidade ao longo do tempo foram utilizados para plotar a curva de progresso da doença e calcular a variável área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

#### 2.4. Delineamento experimental e análise dos dados

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro tratamentos, sendo dois compostos triazólicos e um fungicida comercial, além de uma testemunha que foi exposta ao inóculo. Cada tratamento foi composto por cinco repetições e quatro frutos por unidade experimental. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e quando significativo para o teste F, utilizou-se o teste de Médias de Tukey, a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2018).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença entre os tratamentos quanto à intensidade da doença (tabela 1). Para o tratamento em que os frutos foram tratados com o T16, o valor da variável AACPD (15,00) foi estatisticamente igual ao tratamento com Magnate® (AACPD=8,6) e à testemunha (AACPD=17,00). O valor da variável AACPD para o tratamento em que os frutos foram pulverizados com o T17 foi estatisticamente igual ao tratamento T16.

Tabela 1: Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) antracnose em frutos de mamão (*Carica papaya* L.) tratados com triazóis T16, T17, fungicida Magnate® e testemunha não tratada:

Tratamentos	AACPD
Testemunha	17,00 a
T16	15,00 ab
T17	21,89 a
Magnate®	08,60 b
CV* (%)	28,40

\*Coeficiente de variação.

As médias seguidas pelas mesmas letras não se diferem estaticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p>0.5$ ).

T16 e T17: Novos triazóis formulados a partir de glicerol. (GOMES, 2014)

Na quantificação da antracnose em frutos de mamão tratados com triazóis T16 e T17, somente o tratamento T16 igualou-se estatisticamente ao controle positivo, com redução da severidade da doença. Quando analisados *in vitro*, em trabalho realizado por Gomes (2014), os triazóis T16 e T17, na concentração de 1000 µg/mL, inibiram completamente o crescimento micelial de *C. gloesporioides* e foram estatisticamente iguais em concentrações acima de 500 µg/mL. Utilizando a concentração de 1000 µg/mL em teste *in vivo*, observa-se que os tratamentos T16 e T17 foram estatisticamente iguais entre si e à testemunha. Porém, o tratamento T16 foi similar ao fungicida padrão, portanto, pode-se inferir sua eficiência para a inibição da doença. A menor concentração para a inibição do agente etiológico, *in vitro*, nos resultados apresentados por Gomes (2014), relaciona-se com a interação entre o triazol e o fungo, já que nos testes *in vitro* ocorre o contato direto entre fungo e



fungicida. Em frutos, a concentração do princípio ativo absorvida é determinante, pois fungicidas com ação sistêmica, como triazóis, podem suprimir o desenvolvimento do fungo, e erradicá-lo completamente, caso o mesmo já tenha se instalado no hospedeiro. Porém é necessário que o fungicida seja estável nos tecidos do hospedeiro (WONG; WILCOX, 2001).

A sintetização de novos compostos com anel triazólico e sua ação antifúngica foram reportadas, e esses compostos foram eficientes no controle de diversos patógenos, incluindo alguns do gênero *Colletotrichum* (DESAI et al., 2013; POCHAMPALLI et al., 2012; SINGH; PANDEY; SENGUPTA, 2012). Porém, para a espécie *C. gloeosporioides*, ainda são poucos os estudos a respeito de síntese de novos compostos e sua atividade antifúngica. Costa et al. (2017) reportaram a síntese de novas moléculas 1,2,3-triazol, derivadas do glicerol e a aplicabilidade desses compostos, destacando as atividades fungicidas dos compostos 1- ((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4- il) metil) -1H-1,2,3-triazol-4-il) -ciclo-hexanol e 2- (1 - ((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4- il) metil) -1H-1,2,3-triazol-4-il) propan-2-ol no controle *in vitro* do agente etiológico da antracnose. Bassyouni et al. (2014), também trabalhando com a síntese de novos compostos fungicidas, confirmaram a eficácia na inibição do crescimento micelial do *C. gloeosporioides*, quando utilizaram produtos que possuíam anel triazólico.

Em testes *in vivo* utilizando quatro moléculas triazólicas derivadas do glicerol, Cruz (2017) constatou a redução da severidade da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) a partir de concentrações de 100 µg/mL, comprovando a eficácia na redução da variável AACPD, conforme o presente trabalho. Isso demonstra a possibilidade da utilização dessas moléculas no controle de outros fitopatógenos. Para a antracnose, Demartelaere et al. (2017), testando alguns elicitores no controle da antracnose em frutos de mamão, utilizaram Prochloraz como controle positivo. Esse imidazol proporcionou AACPD de 1,15, reduzindo a severidade da doença, da mesma forma que o produto comercial Magnate®.

Ao plotar a curva de progresso da doença ao longo do tempo, verificou-se que durante o período avaliado houve aumento da severidade da antracnose em todos os tratamentos. Os tratamentos T16 e o Magnate® proporcionaram menores índices de severidade, enquanto que em frutos testemunhas e do tratamento T17, a doença progrediu exponencialmente. (Figura 2).

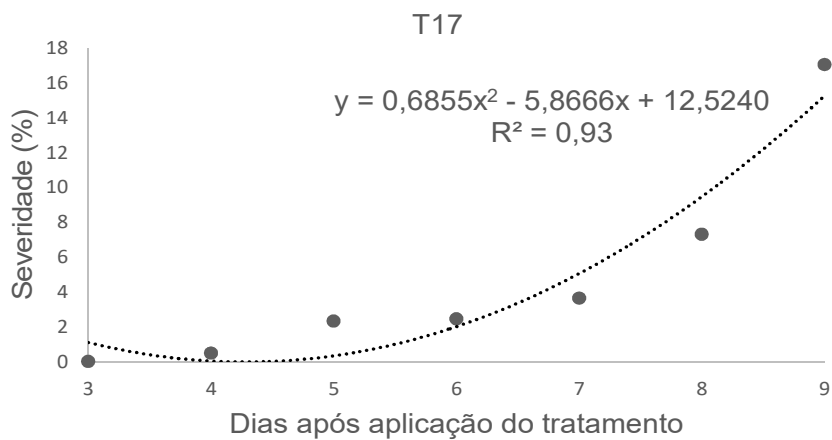
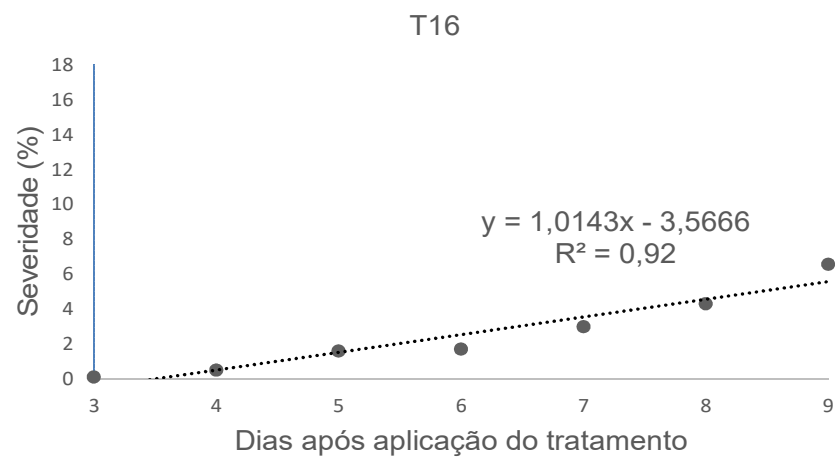
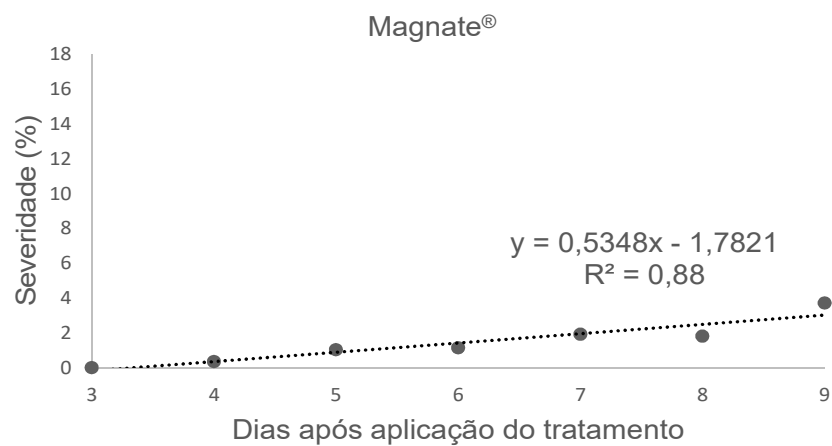
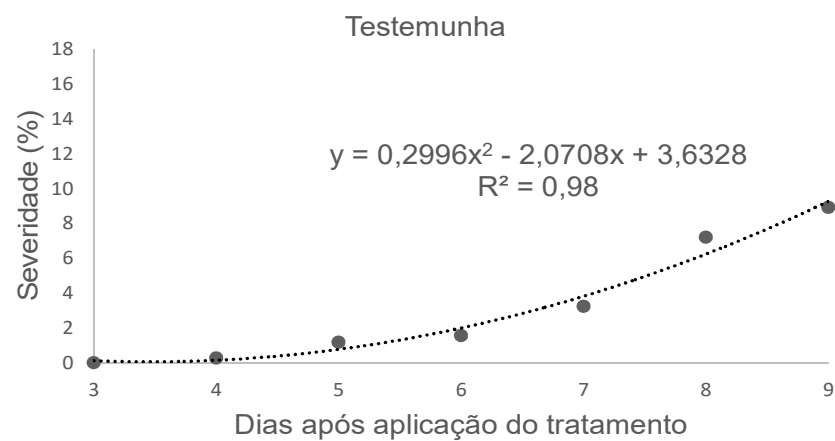


Figura 2: Curva de progresso da severidade da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em frutos de mamão (*Carica papaya* L.), tratados com fungicidas triazóis T16, T17, fungicida comercial Magnate® (controle positivo) e testemunha (controle negativo).

Com base nos modelos de regressão aos dados de severidade da doença ao longo do tempo, verificou-se que a partir do terceiro dia após a aplicação dos tratamentos, a doença aumentou de forma significativa. De acordo com os modelos de regressão ajustados, nos frutos tratados com T17 e testemunha, a doença iniciou-se aos 4,28 e 3,46 dias após a aplicação dos tratamentos (DAAT), respectivamente. Para os tratamentos T16 aos 3,52 e Magnate® aos 3,33. Constatou-se que nos frutos tratados com T17 os sintomas da doença manifestaram-se posteriormente aos frutos dos outros tratamentos, ou seja, aos 4,28 dias, aumentando o período de pós-colheita dos frutos. Porém, o tratamento T16 proporcionou maior preservação dos frutos, devido à redução da severidade da doença (tabela 1). Ainda de acordo com o modelo de regressão ajustado, aos nove dias após a aplicação dos tratamentos, os frutos da testemunha obtiveram severidade máxima de 9,26%, enquanto os do T17, 15,25%. Nesse dia, os valores máximos de severidade para os frutos tratados com T16 e Magnate® foram de 5,26% e 3,03%, respectivamente, ou seja, inferiores.

Ressalta-se que esses produtos são utilizados em larga escala na pós-colheita, podendo promover a seleção de populações de patógenos resistentes a eles (ZAMBOLIM et al., 2002; MORAES; ZAMBOLIM; LIMA, 2008). O produto comercial Magnate® é um dos poucos fungicidas indicados para pós-colheita do mamão, no controle da antracnose, registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA (AGROFIT, 2019). Devido ao fato de o aparecimento dos primeiros sintomas da antracnose ocorrer após o amadurecimento do fruto e sendo o principal causador de danos pós-colheita, o cuidado e a utilização de procedimentos e métodos de controle realizado após a colheita faz-se necessária. Portanto, novos estudos são indispensáveis como forma de oportunizar novas formas de controle (ASSIS; LEONI, 2003; GARCIA et al., 2008; MARQUES et al., 2003; NERY-SILVA et al., 2001; ONG et al., 2013; PARK; DAESCHEL; ZHO, 2004; SINGH; PRASAD; SINHA, 1993; ZAMBOLIM et al., 2002). Para melhorar a caracterização da eficácia desses compostos, sugere-se que concentrações maiores de T16 e T17 sejam utilizadas em testes futuros.

#### **4. CONCLUSÕES**

Houve redução significativa de severidade da doença nos frutos de mamão tratados com o triazol T16, podendo compará-lo ao fungicida comercial Magnate®. Os frutos submetidos ao triazol T17 apresentaram intensidade final da doença semelhante à testemunha, no entanto, aumentou o tempo de prateleira dos frutos devido à menor incidência final. Portanto, pode-se recomendar os dois triazóis testados, desde que outras práticas de manejo pré-colheita para a antracnose sejam realizadas.

## 5. REFERÊNCIAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Consulta de pragas, Brasília, DF, 2019. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso: 15 fev. 2019

ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes comestíveis de quitosana. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 33-38, 2003.

AYÓN-REYNA, L. E. et al. Application of a hydrothermal-calcium chloride treatment to inhibit postharvest anthracnose development in papaya. **Postharvest Biology and Technology**, v. 124, p. 85-90, 2017.

BASSYOUNI, F. A. et al. Antimicrobial, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of triazole, pyrazole, oxadiazine, oxadiazole, and sugar hydrazone-5-nitroindoline-2-one derivatives and a study of their computational chemistry (part II). **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 11, n. 2, 2012.

COSTA, A. V. et al. Synthesis of Novel Glycerol-Derived 1, 2, 3-Triazoles and Evaluation of Their Fungicide, Phytotoxic and Cytotoxic Activities. **Molecules**, v. 22, n. 10, 2017.

CREARY, X. et al. Method for assigning structure of 1, 2, 3-triazoles. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 19, p. 8756-8761, 2012.

CRUZ, T. P. **Atividade de novas moléculas de triazóis sobre *Hemileia vastatrix***. 2017. 81 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.

DEMARTELAERE, A. C. F. et al. Elicitors on the control of anthracnose and post-harvest quality in papaya fruits<sup>1</sup>. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 2, p. 211-217, 2017.

DESAI, S. et al. Synthesis and antimicrobial activities of some new 1,2,4-triazoles derivatives. **Indian Journal Chemistry**, v. 52, p. 1176-1181, 2013.

EL KHADEM, H. S. The mechanism of saccharide osotriazole formation. **Carbohydrate research**, v. 313, n. 3-4, p. 255-257, 1998.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Mamão**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

FERGUSON, G. et al. Diversity of reaction of azoalkenes in cycloadditions. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 12, p. 3361-3369, 1991.

FRAC – Fungicide Resistance Action Committee. FRAC code list ©\*2018: fungicides sorted by mode of action (including FRAC code numbering), 2018. Disponível em: <[http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac\\_code\\_list\\_2018-final.pdf?sfvrsn=6144b9a\\_2](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac_code_list_2018-final.pdf?sfvrsn=6144b9a_2)>. Acesso: 15 jan. 2019.

FRANÇA, R. R. F. et al. Potent Inhibitors of the Enzyme Sterol 14 alpha-demethylase Against *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1483-1516, 2014.

GARCIA, R. et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 163-168, 2008.

GOMES, E. M. C. **Atividade fungicida de triazóis obtidos a partir de glicerol sobre *Colletotrichum gloeosporioides***. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2018. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>>. Acesso em: 15 fev. 2019

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 2001.

KRIVOPALOV, V. P.; SHKURKO, O. P. 1, 2, 3-Triazole and its derivatives. Development of methods for the formation of the triazole ring. **Russian Chemical Reviews**, v. 74, n. 4, p. 339-379, 2005.

KYING, M.; ALI, A. Postharvest biology and technology antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 113-119, 2015.

MARQUES, S. S. et al. Uso de óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em frutos do mamoeiro. **Papaya Brasil-Simpósio do Papaya Brasileiro**, 2003.

MELO, J. O. F. et al. 1, 2, 3-triazolic heterocycles: history, preparations, applications and pharmacological activities. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

MORAES, S. R. G.; TANAKA, F. A. O.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 657-664, 2013.

MORAES, W. S.; ZAMBOLIM, L.; LIMA, J. D. Quimioterapia de banana ‘Prata anã’ no controle de podridões pós-colheita. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 79-84, 2008.

NERY-SILVA, F. A. et al. Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Ciência Agrotécnica**, v. 25, n. 3, p. 519-524, 2001.

ONG, M. K. et al. Effect of gaseous ozone on papaya anthracnose. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 2996-3005, 2013.

PARK, S.I.; DAESCHEL, M.A.; ZHO, Y. Functional Properties of Antimicrobial Lysozyme – Chitosan Composite Films – **Journal of Food Science**, v.69, n.8, 2004.

POCHAMPALLI, J. et al. An Efficient Synthesis, Characterization and Antimicrobial Screening of N-substituted 2-(piperidin-4-yl)-2H-benzo [d][1, 2, 3] Triazoles. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 9, n. 5, p. 471-478, 2012.

POTTS, K. T. The Chemistry of 1, 2, 4-Triazoles. **Chemical Reviews**, v. 61, n. 2, p. 87-127, 1961.

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

SINGH, H. N. P.; PRASAD, M. M.; SINHA, K. K. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease development in banana. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 269-271, 1993.

SINGH, A. K.; PANDEY, O. P.; SENGUPTA, S. K. Synthesis, spectral characterization and biological activity of zinc (II) complexes with 3-substituted phenyl-4-amino-5-hydrazino-1, 2, 4-triazole Schiff bases. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 85, n. 1, p. 1-6, 2012.

SOUZA, S. P.; SEABRA, J. E. A. Integrated production of sugarcane ethanol and soybean biodiesel: environmental and economic implications of fossil diesel displacement. **Energy conversion and management**, v. 87, p. 1170-1179, 2014.

SPOLTI, P. et al. Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. **Plant Disease**, v. 98, n. 5, p. 607-613, 2014.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.) Effects of fungicides on the in vitro control of *Colletotrichum gloeosporioides*, the anthracnosis etiologic agent of the Papaya tree (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

TORRES-CALZADA, C. et al. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). **European journal of plant pathology**, v. 135, n. 1, p. 67-79, 2013.

WANG, K. et al. 1, 2, 3-Triazoles: Gas Phase Properties. **The Journal of organic chemistry**, v. 78, n. 14, p. 7249-7258, 2013.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VENTURA, J.A.; VALE, F.X.R. **Controle de doenças pós-colheita de frutas tropicais**. In: Zambolim, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. p.443-511.

WONG, F. P.; WILCOX, W. F. Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew). **Plant Disease**, v. 85, n. 6, p. 649-656, 2001.

ZAVALA-LEÓN, M. J.; ALEJO, J. C. Escala logarítmica diagramática de severidad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya (*Carica papaya*). **Fitosanidad**, v. 16, n. 2, 2012.

ZHANG, Y. et al. Application of glycerol as a foliar spray activates the defence response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*. **Molecular plant pathology**, v. 16, n. 1, p. 27-37, 2015.

ZHOU, C. H.; WANG, Y. Recent Researches in Triazole Compounds as Medicinal Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 239-280, 2012.



### **CAPÍTULO 3:**

Inibição da germinação de esporos de *Asperisporium caricae* por óleos essenciais de tomilho, orégano, cravo, canela e os componentes majoritários eugenol e carvacrol

#### **RESUMO:**

A pinta-preta (*Asperisporium caricae*) é uma importante doença da cultura do mamoeiro. Essa doença causa lesões de coloração escura nas folhas e nos frutos de mamão, fazendo com que a fruta perca valor comercial, apesar de a doença restringir-se à parte externa dos frutos. A utilização de produtos de origem natural no controle de doenças de plantas vem demonstrando-se eficiente. Portanto, objetivou-se avaliar a eficiência de óleos essenciais (OE) de orégano, cravo, canela e tomilho, e seus componentes majoritários, carvacrol e eugenol, na inibição da germinação de esporos de *A. caricae*. Inicialmente realizou-se a avaliação de todos os compostos a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e os que inibiram acima de 95% da germinação de esporos foram utilizados para novas avaliações, nas concentrações de 0; 250; 500; 1000; 1500 e  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para determinação da concentração inibitória de 50% (DE50) e 100% (DE100) da germinação de esporos *A. caricae*. Foram considerados esporos germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo com comprimento maior ou igual ao comprimento do conídio. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial  $5 \times 6 + 1$  (5 OEs, 6 concentrações e uma testemunha adicional), com cinco repetições. Nos testes preliminares, apenas o OE tomilho proporcionou atividade inibitória inferior a 95%, assim, procedeu-se a avaliação dos demais tratamentos nas seis concentrações citadas. O carvacrol inibe 50% e 100% a germinação de esporos de *A. caricae* em concentrações de  $166,76 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $690,74 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o OE orégano inibe em  $257,29 \mu\text{g mL}^{-1}$  (DE50) e  $789,41 \mu\text{g mL}^{-1}$  (DE100). As concentrações inibitórias de 50% e 100% utilizando OE cravo foram  $292,74 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $839,16 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Para o OE de canela, determinou-se DE50 de  $396,41 \mu\text{g mL}^{-1}$  e DE100 de  $1015,94 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O eugenol, inibe em 50% e 100% a germinação de esporos do fungo em concentrações de  $279,59 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $823,34 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Os valores de DE50 e DE100 dos OE cravo, OE canela e eugenol foram superiores aos encontrados para OE orégano e carvacrol. Assim, devido às menores concentrações necessárias para inibir em 50% e 100% a germinação de esporos de *A. caricae* por OE de orégano e o seu componente majoritário carvacrol, comparado aos demais tratamentos, constatou-se que esses foram mais eficientes na redução da germinação de esporos do fungo, e são tratamentos alternativos para o manejo da pinta-preta em frutos de mamão, associados a outras práticas de manejo em campo.

**PALAVRAS CHAVE:** Pinta-preta; orégano; cravo; canela.

## 1. INTRODUÇÃO

O mamão (*Carica papaya L.*) é um importante fruto produzido em solo brasileiro, e o país se destaca como o segundo maior produtor a nível mundial, e maior exportador, produzindo 1.057.101 toneladas em 26.526 hectares de área colhida no ano de 2017 (IBGE, 2018). Isso ocorre devido às características tropicais do país, ambiente propício para o cultivo do mamoeiro (EMBRAPA, 2018). A nível nacional, os estados da Bahia, Espírito Santo e Ceará destacam-se como os maiores produtores, com produção de 368.875; 311.150; e 115.525 toneladas, respectivamente.

A ocorrência de doenças representa um problema aos produtores de mamão, devido à desvalorização e inviabilidade de comércio e exportação do fruto. A pinta-preta (*Asperisporium caricae*) pode atingir 100% de incidência em frutos, em áreas onde não é feito o tratamento (AMORIM et al., 2016). Os sintomas dessa doença são caracterizados por lesões em frutos e na parte abaxial das folhas. As lesões formam manchas circulares, com cerca de 4 mm de diâmetro, de coloração escura. Enquanto na parte adaxial, ocorrem lesões de cor pardo-clara com um halo amarelo, que corresponde à lesão da face abaxial. Nos frutos, os sintomas característicos da pinta-preta aparecem em frutos ainda verdes, na forma de manchas circulares, semelhante às lesões presentes nas folhas. Os tamanhos das lesões desenvolvem-se de acordo com os frutos, até se tornarem lesões pretas, ásperas, salientes, mas que se limitam apenas a superfície da casca. As lesões não afetam a polpa do fruto, porém inviabiliza a comercialização do fruto (AMORIM et al., 2016; SANTOS FILHO et al., 2007).

Para o controle da pinta-preta são realizadas aplicações de agroquímicos quando surgem os sintomas iniciais da doença. Em 2019, 49 produtos comerciais estão registrados no Brasil para o controle da pinta-preta, pertencentes aos grupos químicos: isoftalonitrila, estrobilurina, triazol, benzimidazol, alquilenobis (ditiocarbamato), imidazol e inorgânicos (AGROFIT, 2019).

Como os patógenos tendem a desenvolver resistência a fungicidas químicos comerciais, quando esses são utilizados de forma irracional, o estudo de outros produtos e estratégias de controle de doenças faz-se necessário. Produtos naturais, como óleos essenciais e extratos vegetais podem vir a ser uma alternativa. O uso de óleos essenciais já foi reportado por diversos autores no controle de doenças de

plantas (GOGGI et al., 2008; HILLEN et al., 2012; KOTAN et al., 2013; LA TORRE et al., 2016; PEREIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2017; TOMAZONI et al., 2017).

Plantas como canela (*Cinnamomun zeylanicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) podem produzir metabólitos secundários denominados óleos essenciais, que possuem atividades antibacterianas e antifúngicas já comprovadas (JAAFARI et al., 2007; SANTOS et al., 2017; PINTO et al., 2007). As atividades biológicas de cada OE são atribuídas aos componentes químicos em sua composição, como os componentes majoritários, eugenol (2-metoxi-4-prop-2-enilfenol) e o carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol; 2-Metil-5-(1-metilletil)fenol). O eugenol é o componente majoritário dos OE de canela e cravo, representando 77,95% (LIMA, 2018) e 88.58% (CHAIEB et al., 2007) da composição, respectivamente. O carvacrol é o majoritário dos óleos de orégano e tomilho, sendo 67,67% e 23,93% (GONÇALVES, 2018) respectivamente. Portanto, o objetivo com este estudo foi avaliar os OE de canela, cravo, orégano e tomilho, e dos componentes majoritários, eugenol e carvacrol, quanto à capacidade de inibir a germinação de esporos de *A. caricae*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas Agrícolas e Florestais (LEMP) do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) e no Laboratório de Análises Vegetais, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES), localizados na cidade de Alegre/ES.

### 2.1. Obtenção dos isolados de *Asperisporium caricae*

Os esporos de *A. caricae* foram obtidos de folhas de mamoeiros com sintomas da doença, infectados naturalmente pelo fungo e que não foram tratados com agroquímicos. As plantas foram provenientes da Área Experimental da Universidade Federal do Espírito Santo. As folhas foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Vegetais, onde foi realizada a raspagem das pústulas utilizando estilete. Os esporos retirados foram utilizados no preparo de uma suspensão de esporos ( $2,0 \times 10^5$  esporos/mL), calibrados com o auxílio de um hemacitômetro (câmara de Neubauer). A utilização da suspensão de esporos fez-se necessária devido à complexidade do cultivo de *A. caricae* em ausência de hospedeiro, por ser considerado um fungo biotrófico (VIVAS, 2014).

### 2.2. Obtenção e avaliação dos OEs

Os óleos essenciais (OE) utilizados foram obtidos comercialmente, sendo: OE de orégano (*Origanum vulgare* L.), OE de tomilho (*Thymus vulgaris*), OE de cravo (*Syzygium aromaticum*), OE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), eugenol e carvacrol. A avaliação do efeito dos OEs na inibição da germinação dos esporos de *A. caricae* foi realizada em duas etapas, seguindo a metodologia proposta por Cruz (2017).

#### 2.2.1. Avaliação *in vitro* de esporos germinados a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ :

.

Foram preparadas 7 mL de soluções estoque dos OEs a 20000 µg mL<sup>-1</sup>, contendo 10% de DMSO e 8% de Tween 80®, que ao serem incorporadas ao meio de cultura proporcionam a concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup> (concentração mínima do fungicida comercial Tecto®, recomendado para o controle da pinta-preta, utilizado como padrão) dos OE de orégano, OE tomilho, OE canela, OE cravo, eugenol e carvacrol.

Placas de Petri (60 x 15 mm) foram preparadas com 8mL de meio de cultura ágar-água. Outras placas (90 x15 mm) foram preparadas contendo 20 mL meio de cultura ágar-água + OEs a 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Após a solidificação dos meios, foram retirados três discos de 6 mm de diâmetro, com o auxílio de um furador, nas placas que continham ágar-água + OEs, e transferidos para as placas que continham o meio ágar-água. Após a transferência dos discos, foram depositados 20µl da suspensão de 2x10<sup>5</sup> esporos/mL de *A. caricae*, com o auxílio de uma micropipeta (20 µl -100 µl), na superfície de cada disco. As placas foram vedadas com Parafilm® e levadas para a câmara tipo BOD, a 25°C, por um fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas de incubação, a contagem dos esporos germinados foi realizada.

Na contagem da germinação dos esporos realizou-se a retirada dos discos de ágar-água + OEs da superfície das placas, e depositaram-se os mesmos em lâminas para microscópio. Logo após, procedeu-se a aplicação de uma gota de lactofenol, para paralisar a germinação dos esporos, e realização da contagem. As lâminas contendo o disco + lactofenol foram levadas ao microscópio óptico, no qual foram contados o número de esporos germinados (esporos que apresentassem tubo germinativo de comprimento maior ou igual ao comprimento do esporo).

A porcentagem de inibição dos esporos germinados a 1000 µg mL<sup>-1</sup> dos OEs de orégano, tomilho, cravo e canela, eugenol e carvacrol foi determinada com base na fórmula adaptada de porcentagem de inibição da germinação/esporulação (PIG) (EDGINGTON; KHEW; BARRON, 1971):

$$PIG = \frac{Germ_{\text{testemunha}} - Germ_{\text{tratamento}}}{Germ_{\text{testemunha}}} \times 100$$

Dado que:

PIG: Porcentagem da inibição da germinação/esporulação;

Germ. testemunha: valor da germinação/esporulação da testemunha; e

Germ. tratamento: valor da germinação/esporulação de cada tratamento.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com oito tratamentos (OEs de orégano, tomilho, cravo e canela, eugenol, carvacrol, testemunha positiva (Tecto®) e testemunha negativa (meio de cultura ágar-água), com cinco repetições e três discos por repetição. Os valores obtidos de PIG foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico R (R CORE TEAM, 2018).

#### 2.2.2. Avaliação *in vitro* de esporos germinados a 250; 500; 1000; 1500 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ :

Após a realização da avaliação dos OEs a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , procedeu-se a avaliação dos OEs que proporcionaram inibição da germinação superior a 95% a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em concentrações de 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a fim de determinar a atividade antifúngica máxima desses compostos quanto à germinação de esporos de *A. caricae*.

Utilizou-se a metodologia do item 2.2.1, e a partir dos valores de PIG (porcentagem de inibição da germinação de esporos) obtidos foram propostas as equações ajustadas dos tratamentos, para o cálculo das concentrações inibitórias de 50% (DE50) e 100% (DE100) da germinação de esporos de *A. caricae*.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 5 x 6 + 1 (cinco OEs, seis concentrações e uma testemunha adicional), com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão, a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2018).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O teste inicial dos OEs na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  demonstrou que o fungicida comercial Tecto®, o OE de orégano, e os componentes majoritários eugenol e carvacrol foram capazes de inibir 100% da germinação dos esporos do fungo (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de inibição da germinação de esporos (PIG) de *Asperisporium caricae*, por óleos essenciais (OE) de tomilho, canela, cravo, orégano e seus componentes majoritários eugenol e carvacrol na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de meio de cultura ágar-água:

TRATAMENTOS	PIG (%)
Testemunha	0 c
Tomilho	81,14 b
Canela	98,65 a
Cravo	99,73 a
Orégano	100 a
Eugenol	100 a
Carvacrol	100 a
Tecto®	100 a
CV* (%)	5,31

\*Coeficiente de variação

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p>0.5$ ).

Os OEs de cravo e canela proporcionaram 98,65 e 99,73% de inibição da germinação de esporos, respectivamente, sendo considerados estatisticamente iguais aos OE de orégano e aos componentes majoritários eugenol e carvacrol. O OE de tomilho foi o que apresentou menor capacidade de inibição da germinação dos esporos, com 81,14% (Tabela 1).

Os OE cravo (*Syzygium aromaticum*) e OE canela (*Cinnamomun zeylanicum*) possuem majoritariamente em sua composição o eugenol, em proporções de 88,58 e 77,95%, respectivamente (LIMA, 2018; CHAIEB, 2007). Apesar das diferentes

proporções do componente majoritário nas composições desses OEs, os resultados quanto à inibição da germinação de esporos não se diferiram estatisticamente entre si.

A menor ação inibitória do OE tomilho (*Thymus vulgaris*) pode-se sugerir que a porcentagem do componente majoritário carvacrol em sua composição, 23,93%, quantidade inferior a esse componente majoritário no OE de orégano (*Origanum vulgare* L.) (SILVA et al., 2010; SIVROPOULOU et al., 1996). O OE orégano possui 67,67% desse componente e inibiu em 100% a germinação de esporos de *A. caricae* a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (LIMA, 2018; GONÇALVES, 2018).

OE tomilho foi excluído do segundo experimento pois proporcionou menor atividade inibitória, comparado aos demais tratamentos (Tabela 1). Quando avaliou-se nas diferentes concentrações os demais tratamento, eles apresentaram diferenças quanto à inibição da germinação de esporos (Figura 1). O aumento da concentração foi determinante para ocasionar a ação inibitória dos OEs e seus componentes majoritários.



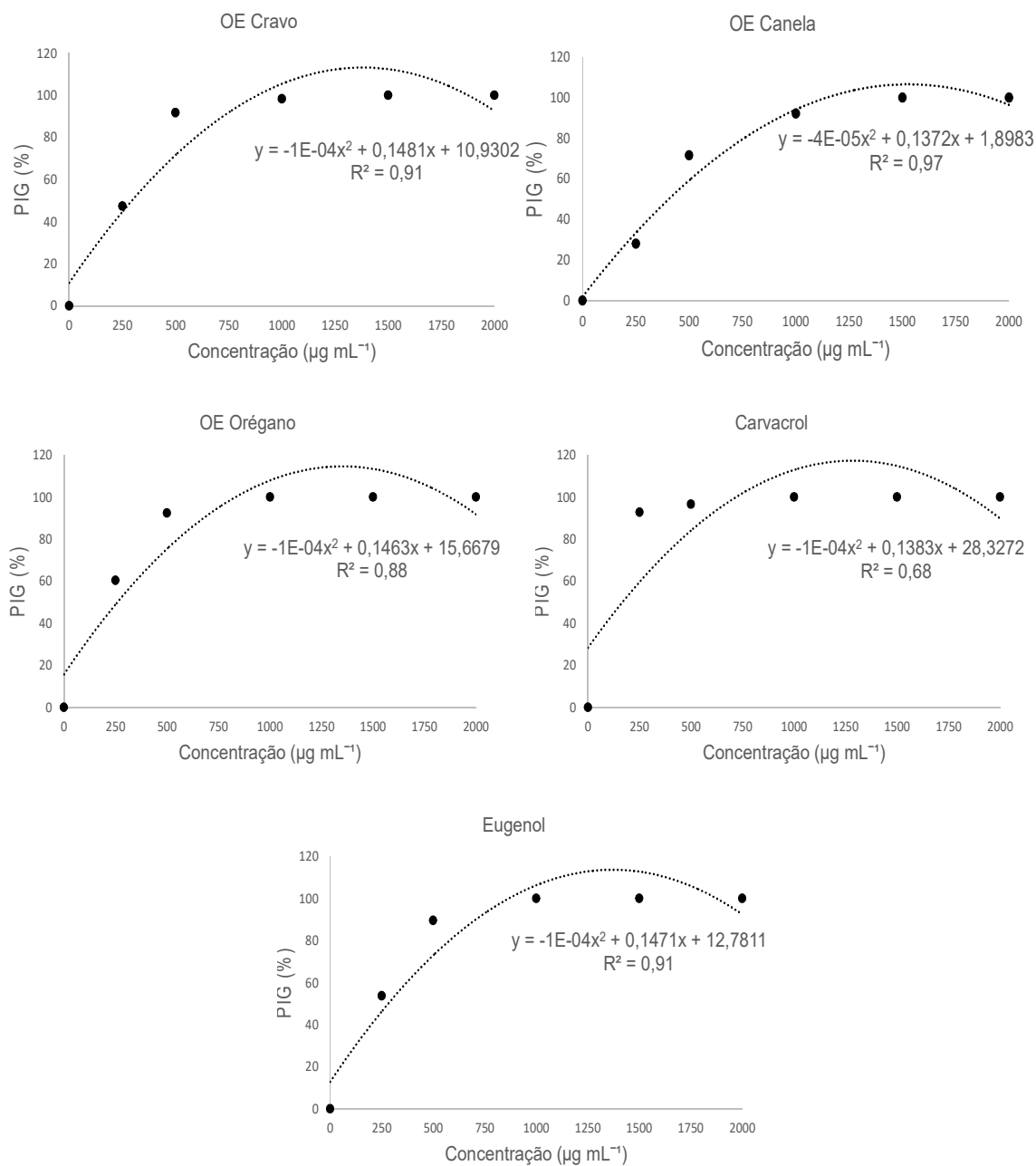


Figura 1: Efeito *in vitro* dos OEs de orégano, cravo e canela, e seus componentes majoritários, eugenol e carvacrol, na inibição da germinação de esporos de *Asperisporium caricae*, nas concentrações de 0, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 µg mL<sup>-1</sup>.

Ao avaliar o efeito das concentrações de 0; 250; 500; 1000; 1500; 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do OE canela, OE cravo, OE orégano e dos componentes majoritários, eugenol e carvacrol, estimou-se as concentrações inibitórias de 50% (DE50) e 100% (DE100) da germinação dos esporos de *A. caricae* conforme equações ajustadas (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração inibitória de 50% (DE50) e 100% (DE100) da germinação de esporos de *Asperisporium caricae* em meio ágar-água, contendo óleos essenciais (OE) de cravo, canela e orégano e seus componentes majoritários carvacrol e eugenol, nas concentrações 250; 500; 1000; 1500; 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ :

Tratamento	Equação	DE50 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	DE100 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
OE Canela	$y = -4\text{E-}05x^2 + 0,1372x + 1,8983$ $R^2 = 0,97$	396,41	1015,94
OE Cravo	$y = -1\text{E-}04x^2 + 0,1481x + 10,9302$ $R^2 = 0,91$	292,74	839,16
OE Orégano	$y = -1\text{E-}04x^2 + 0,1463x + 15,6679$ $R^2 = 0,88$	257,29	789,41
Eugenol	$y = -1\text{E-}04x^2 + 0,1471x + 12,7811$ $R^2 = 0,91$	279,59	823,34
Carvacrol	$y = -1\text{E-}04x^2 + 0,1383x + 28,3272$ $R^2 = 0,68$	166,76	690,74

O carvacrol, componente majoritário do OE de orégano, proporcionou a menor concentração de DE100 (690,74  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), juntamente com o OE orégano (DE100=789,41  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ambos os tratamentos citados foram os que apresentaram menores valores de DE50 (carvacrol: 166,76  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; orégano: 257,29  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente). Tal fato comprova a atividade fungicida desses compostos, já descrita por diversos autores, ao propor a avaliação da atividade fungicida e fungistática do OE de orégano e do carvacrol (MITCHELL et al., 2010; RHAYOUR et al., 2003). Como Gonçalves (2018), que avaliou a atividade do OE orégano e do carvacrol no controle de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, e constatou que 400 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, inibiram 100% do crescimento micelial do fungo. Também para o controle de *F. oxysporum*, Viana (2013) avaliou a atividade do OE orégano, em concentrações de 128, 256, 512 e 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  houve inibição de 67% do crescimento micelial do fungo. A maior concentração utilizada por Viana (2013) e o menor PIG pode estar ligado à composição do OE, pois pode variar em função da planta em que foi realizada a extração do óleo.

A atividade inibitória da germinação proporcionada por OEs está relacionada com a porcentagem do componente majoritário em questão (SILVA et al., 2010; SIVROPOULOU et al., 1996). O carvacrol já teve sua eficiência comprovada no controle *in vitro* de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* por Gonçalves et al. (2015), em que a concentração de 225  $\mu\text{g mL}^{-1}$  inibiu completamente o crescimento micelial dos fungos em questão. Para a completa inibição da germinação de *A. caricae* sugere-se a concentração de 690,74  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , superior à necessária por *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Neri et al. (2009) também relataram atividade inibitória no crescimento micelial de *Neofabraea alba* utilizando carvacrol. Asthana; Dixit; Kishore (1988) utilizaram o eugenol (componente majoritário dos OE cravo OE canela) e concluíram que em concentração de 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , aproximadamente ao valor calculado de DE50 neste trabalho (279,59  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), seria eficiente na inibição de 100% do crescimento micelial de fungos de armazenamento, como o *Aspergillus flavipes*, *Colletotrichum capsici*, *Alternaria tenuis*. A eficiência desses componentes majoritários no controle de diversos fitopatógenos é comprovada, mesmo que as concentrações variem nos diferentes trabalhos.

Os OE canela e cravo, que possuem o eugenol como componente majoritário, proporcionaram valores de DE50 e DE100 superiores aos do OE orégano (majoritário: carvacrol). Para inibir 50% da germinação dos esporos de *A. caricae* foram necessárias as concentrações de 396,41  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 292,74  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de OE canela e OE cravo, respectivamente. Enquanto que o eugenol inibe em 50% a germinação de esporos na concentração de 279,59  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Combrinck; Regnier; Kamatou (2011) avaliaram OE de cravo e OE de canela no controle de *Lasodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*; *Alternaria citrii*; *Penicillium digitatum*; *Alternaria alternata*; *Botrytis cinerea*; *in vitro*, e a concentração necessária para inibir em 100% *L. theobromae*, *C. gloeosporioides*; *A. alternata*; *B. cinerea*, utilizando OE canela, foi a superior encontrada para inibição de 100% da germinação de esporos de *A. caricae*, em que o valor de DE100 foi 1015,94  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O DE100 do OE cravo para o agente etiológico da pinta preta foi 839,16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , concentração inferior a DE100 utilizada na inibição dos fitopatógenos avaliados pelo autor por esse OE. A inibição de 100% de *Lasodiplodia theobromae*, *Alternaria citrii*, *Alternaria alternata* por eugenol também ocorre em concentrações superiores às obtidas neste trabalho (DE100 = 823,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os valores de DE100 propostos para o agente etiológico

da pinta-preta do mamoeiro, utilizando OE de cravo e o componente majoritário eugenol, foram inferiores aos utilizados por Combrinck; Regnier; Kamatou (2011), enquanto que o DE100 do OE canela foi inferior, comparado com alguns fitopatógenos avaliados. Constatou-se então a maior sensibilidade de *A. caricae* aos OE de cravo e ao eugenol, quando comparados aos fitopatógenos avaliados pelo autor.

Ao avaliar OE de capim-limão, OE tomilho e OE de cravo, no controle de *C. gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamão *in vitro*, Gomes (2008) verificou que o OE cravo proporcionou maior inibição do crescimento micelial, o que corrobora com os resultados obtidos para *A. caricae*, pois dentre os OEs que possuem o eugenol como componente majoritário, o OE cravo possuiu menores valores de DE50 e DE100. Porém, na avaliação do efeito de óleos essenciais no controle de *Lecanicillium fungicola* (agente etiológico da bolha seca do champignon), Santos et al. (2017) observaram que os OE de canela (2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 8000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 16000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e OE cravo (4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 8000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 16000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) inibiram em 100% a germinação de conídios do fungo, enquanto que o OE orégano apresentou maior índice de inibição em concentração de 16000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (24% de inibição). Resultados divergentes aos obtidos para *A. caricae*, já que o OE orégano demonstrou atividades inibitórias em concentrações menores.

A complexidade de cultivar fungos biotróficos axenicamente é um fator limitante para estudos com *A. caricae*, avaliando óleos essenciais ou outros compostos (GARCIA et al., 2007; VIVAS, 2014). Os resultados obtidos apresentam uma alternativa à utilização de agroquímicos convencionais, propondo a utilização de produtos de origem vegetal para o controle da doença.

#### 4. CONCLUSÕES

O OE de orégano ( $DE_{50}=257,29 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $DE_{100}=789,41 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o carvacrol ( $DE_{50}=166,76 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $DE_{100}=690,74 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) podem ser recomendados como opções para o controle do agente etiológico da pinta-preta do mamão por proporcionarem as menores concentrações capazes de inibir em 50% e 100% a germinação de esporos de *A. caricae*, em relação aos demais OE analisados.

## 5. REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Consulta de pragas, Brasília, DF, 2019. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso: 15 fev. 2019
- AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 5° ed. [s.l.] Agronômica Ceres, 2016.
- ASTHANA, A.; DIXIT, K.; KISHORE, N. Toxicity of citral and eugenol against some storage fungi. **Archives of Phytopathology & Plant Protection**, v. 24, n. 5, p. 417-421, 1988.
- CHAIIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.
- COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 344-349, 2011.
- CRUZ, T. P. **Atividade de novas moléculas de triazóis sobre *Hemileia vastatrix***. 2017. 81 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.
- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Mamão. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao>>. Acesso em: 03 nov. 2018.
- GARCIA, O. et al. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, v. 111, n. 4, p. 443-455, 2007.
- GONÇALVES, A. H. et al. Atividade fungitóxica in vitro dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1007-1015, 2015.
- GONÇALVES, D. C. **Efeito do tratamento de sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) com óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e carvacrol na incidência da murcha de *Fusarium* em mudas**. 2018. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.

GOGGI, A. S. et al. Integration of natural seed treatments in organic and open-pollinated corn systems. **Leopold Center Completed Grant Reports**, p. 295, 1 jan. 2008.

GOMES, L. I. S. **Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* e efeito de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro**. 2008. 54f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

HILLEN, T. et al. Antimicrobial activity of essential oils on the in vitro control of some fungal phytopathogens and on seed treatment. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2018. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>>. Acesso em: 15 fev. 2019

JAAFARI, A. et al. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 477-491, 2007.

KOTAN, R. et al. Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. **Scientia Horticulturae**, v. 153, p. 34-41, 2013.

LA TORRE, A. et al. Using plant essential oils to control *Fusarium* wilt in tomato plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 3, p. 487-496, 2016.

LIMA, W. P. **Efeito dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Cinnamomum zeylanicum* e seus componentes majoritários sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***. 2018. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.

MITCHELL, T. C. et al. *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 755-760, 2010.

NERI, F. et al. Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, n. 3, p. 425-430, 2009.

PEREIRA, A. J. et al. Inibição in vitro do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 11, p. 113-120, 2013.

PINTO, E. et al. In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n. 2, p. 135-141, 2007.

RHAYOUR, K. et al. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 5, p. 356-362, 2003.

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

SANTOS, T. L. dos et al. Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. **Ciência Rural**, v. 47, n. 5, 2017.

SANTOS FILHO, H. P. et al. Monitoramento e controle da pinta preta do mamoeiro. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, 2010.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1202-1205, 1996.

TOMAZONI, E. Z. et al. In vitro and in vivo activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 223, p. 72-77, 2017.

VIANA, W. P. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre fungos oportunistas do gênero *Fusarium***. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

VIVAS, J. M. S. **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS HIPERPARASITAS DE *Asperisporium caricae***. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.



## CONCLUSÃO GERAL

O teste de solventes e surfactantes no capítulo 1 foi determinante e irá auxiliar pesquisas futuras em testes utilizando o agente etiológico da antracnose do mamoeiro. Dentre os compostos utilizados, apenas as concentrações de 1% a 5% de Tween 80® não influenciaram no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, recomendando-se então sua utilização no preparo de soluções com OE e triazóis.

Nos testes *in vivo* do capítulo 2 houve redução da severidade da antracnose nos frutos que foram tratados com as moléculas de T16. Os frutos tratados com a molécula T17 obtiveram maiores índices de severidade, porém, a doença nesses frutos teve início aos 4,28 dias após a aplicação do tratamento, enquanto que nos frutos tratados com T16, o menor índice de severidade ocorreu no dia 3,52. Portanto, pode ser recomendada a utilização desses triazóis para o tratamento da antracnose em frutos de mamão como opção na pós-colheita.

No capítulo 3, ao avaliar a porcentagem de inibição da germinação de esporos de *A. caricae*, agente etiológico da pinta-preta do mamoeiro, o OE de orégano e o carvacrol inibiram em 50% e 100% a germinação de esporos utilizando concentrações menores comparando-os aos outros tratamentos utilizados.

Constatou-se então que o estudo de moléculas e produtos naturais possibilita o controle de doenças de plantas e pode ser uma alternativa para reduzir a utilização de agroquímicos.